



REC'D 20 DEC 1999

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

09/857008

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 20 JUIL. 1999

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITE

PRESENTE OU TRANSMIS
CONFORMEMENT A LA REGLE
17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES 031298
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 98 15309-
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75
DATE DE DÉPÔT 03 DEC 1998

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☒ demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent
7/08/1997

références du correspondant
ST98046

téléphone

0155717326

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

NOUVEAUX AGENTS DE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES, COMPOSITIONS LES
CONTENANT ET LEURS UTILISATIONS.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN 3 0 4 4 6 3 2 8 4

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

RHONE-POULENC RORER S.A.

Forme juridique

S.A.

Nationalité (s)

Française

Adresse (s) complète (s)

20 avenue Raymond Aron
92160 ANTONY

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs ☐ oui ☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☒ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande
RHONE-POULENC RORER S.A.

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

Niederst
NIEDERST Claire

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

[Signature]

Division Administrative des Brevets

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

9815309

ST98046

Titre de l'invention :

NOUVEAUX AGENTS DE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES, COMPOSITIONS LES
CONTENANT ET LEURS UTILISATIONS.

Le (s) soussigné (s)

RHONE-POULENC RORER S.A.
20 avenue Raymond Aron
92160 ANTONY (FRANCE)

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom
patronymique) :

HERSCOVICI JEAN

14 rue du Château des Rentiers - 75013 PARIS (FRANCE)

HOFLAND Hans

1439 Terra Nova Boulevard - Pacifica, CA94044 (USA)

JACOPIN Christophe

11 rue du Bois des Roches - 91700 SAINTE-GENEVIEVE DES BOIS (FR)

SCHERMAN Daniel

10 rue Erard - 75012 PARIS (FRANCE)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient
(société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

RHONE-POULENC RORER S.A.
Fondateur de Pouvoir

Antony, le 3 décembre 1998

Niederst
NIEDERST Claire

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
4, 45 + Dessins			α	08.04.99	20 MAI 1999 - SR

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

NOUVEAUX AGENTS DE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES,
COMPOSITIONS LES CONTENANT ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention se rapporte à de nouveaux agents de transfert, les compositions les contenant et leurs utilisations pour le transfert *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo* d'acides nucléiques dans les cellules.

Avec le développement des biotechnologies, la possibilité de transférer efficacement des acides nucléiques dans les cellules est devenue une technique de base avec de nombreuses applications biotechnologiques. Il peut s'agir du transfert d'acides nucléiques dans des cellules *in vitro*, par exemple pour la production de protéines recombinantes, ou au laboratoire pour l'étude de la régulation de l'expression des gènes, le clonage de gènes ou tout autre manipulation impliquant l'ADN. Il peut également s'agir du transfert d'acides nucléiques dans des cellules *in vivo*, par exemple pour la réalisation de vaccins, des études de marquage ou également des approches thérapeutiques. Il peut encore s'agir du transfert de gènes dans des cellules prélevées d'un organisme, en vue de leur réadministration ultérieure, par exemple pour la création d'animaux transgéniques.

Actuellement, le moyen le plus répandu pour transférer des gènes dans des cellules est l'utilisation de vecteurs viraux. Mais ceux-ci n'étant pas complètement dénués de risques, plusieurs autres méthodes basées sur l'emploi de vecteurs synthétiques ont été proposées. Ces vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales : complexer et compacter l'acide nucléique à transférer, et promouvoir son passage à travers la membrane plasmique et éventuellement à travers les deux membranes nucléaires.

Plusieurs familles de vecteurs synthétiques ont été développées, comme par exemple les polymères ou encore les vecteurs biochimiques (constitués d'une protéine cationique associée à un récepteur cellulaire), mais un progrès important a surtout été accompli en transfection non-virale avec le développement des lipofectants, et plus particulièrement des lipides cationiques. Il a ainsi été mis en évidence que les lipides

cationiques, du fait de leur charge globale positive, interféraient spontanément avec l'ADN globalement négatif, formant des complexes nucléolipidiques capables de fusionner avec les membranes cellulaires, et permettaient ainsi la libération intracellulaire de l'ADN.

5 Différentes sortes de lipides cationiques ont ainsi été synthétisés : des lipides comportant un groupement ammonium quaternaire (par exemple le DOTMA, DOTAP, DMRIE, DLRIE...), des lipopolyamines comme par exemple le DOGS, le DC-Chol ou encore les lipopolyamines divulguées dans la demande de brevet
10 WO 97/18185, des lipides associant à la fois un groupement ammonium quaternaire et une polyamine comme le DOSPA, ou encore des lipides comportant diverses autres entités cationiques, notamment des groupes amidinium (par exemple l'ADPDE, ADODE ou les lipides de la demande de brevet WO 97/31935). En fait, la diversité structurelle des lipides cationiques reflète en partie l'observation de la relation structure-activité.

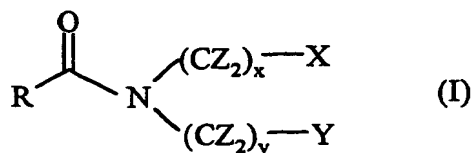
15 Toutefois, l'emploi de ces vecteurs synthétiques pose encore de nombreuses difficultés, et leur efficacité reste à améliorer. Notamment, il serait souhaitable de pouvoir disposer de vecteurs non-cationiques ou moins cationiques, et ce pour deux raisons principales. La première est que les complexes formés entre l'acide nucléique et les vecteurs de transfert, du fait de leur charge globale positive, ont tendance à
20 s'accumuler dans le système vésiculoendothélial des cellules et provoquent ainsi une réponse inflammatoire. La seconde raison est une question d'amélioration de la biodisponibilité, c'est-à-dire la capacité des complexes à atteindre les cellules cibles à transfecter. En effet, du fait de la charge globale positive des complexes formés, les protéines du plasma ont tendance à s'adsorber à leur surface. les complexes d'acides
25 nucléiques ne peuvent donc plus atteindre les cellules cibles, ce qui, par voie de conséquence, entraîne une diminution de l'efficacité de transfert par rapport à la quantité de complexes injectée.

Par ailleurs, la formulation stable des vecteurs synthétique développés jusqu'à aujourd'hui à de faibles rapports de charges est en général difficile, voire impossible. Dans toute la suite, "rapport de charge" signifie le rapport des charges positives de l'agent de transfert sur les charges négatives de l'ADN. Ce rapport est souvent exprimé en nmoles d'agent de transfert par μg d'ADN.

Ce sont ces problèmes que les nouveaux agents transfectants mis au point par la demanderesse, et qui font l'objet de la présente invention, se proposent de résoudre. En effet, leur structure particulière qui forme une ancre hydrophobe avec deux têtes hydrophiles, dont l'une au moins est un sucre, permet de diminuer la densité de charge de ces vecteurs par rapport aux lipides cationiques connus de l'homme du métier, car ces structures forment une sorte "d'écran de charges". La biodisponibilité des complexes formés avec les acides nucléiques est en conséquence améliorée, car cela entraîne une diminution de l'adsorption des protéines plasmatiques à leur surface. De plus, le fait de "masquer" les charges représente une amélioration importante sur le plan de la toxicité. Enfin, les agents transfectants de la présente invention sont particulièrement avantageux d'un point de vue physico-chimique. En effet, la demanderesse a mis en évidence, de façon tout à fait surprenante et inattendue, que les agents de transfert selon l'invention sont particulièrement stables lorsqu'ils sont mis en contact avec des acides nucléiques à de faibles rapports de charge.

Ainsi, un premier objet de l'invention concerne de nouveaux agents de transfert d'acides nucléiques qui comportent une partie hydrophobe liée à au moins deux parties hydrophiles dont l'une au moins est un sucre.

Plus particulièrement, les agents de transfert selon l'invention sont représentés par la formule générale (I) :



pour laquelle :

- R représente un polycation,
- Z représente un atome d'hydrogène ou un atome de fluor, les différents Z étant indépendant les uns des autres,
- 5 - x et y, indépendamment l'un de l'autre, représentent un entier compris entre 10 et 22 inclus, et
- X et Y, indépendamment l'un de l'autre, représentent un atome d'hydrogène, un groupement OAlk, Alk représentant un alkyle droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone, un groupement amino, un sucre, un peptide, un oligonucléotide ou un
- 10 marqueur,
- l'un au moins des substituants X et Y étant un sucre.

On entend au sens de l'invention par "sucre", toute molécule de mono-, oligo- ou polysaccharide qui interagit avec des récepteurs cellulaires, comme par exemple les lectines de type S, et de façon générale tout récepteur cellulaire connu de l'homme

15 du métier [*The lectins , Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*, I.E. Liener et al., Academic Press, N.Y. 1986; Irwin J. Goldstein et al., *Adv. in Carbohydr. Chem. Biochem.*, 35 (1978, pp 127-340)]. On peut citer à titre d'exemple les sucres suivants : les pyranoses et les furanoses, par exemple le glucose, le mannose, le rhamnose, le galactose, le fructose, ou encore le maltose, le lactose,

20 le saccharose, le sucrose, le fucose, le cellobiose, l'allose, le laminarabiose, le gentiobiose, le sophorose, le mélibiose etc... De préférence, le ou les sucres sont choisis parmi le glucose, le mannose, le rhamnose, le galactose, le fructose, le lactose, le saccharose et le cellobiose. De plus, il peut également s'agir de sucres dits "complexes", c'est-à-dire de plusieurs sucres couplés covalamment les uns aux autres,

25 chaque sucre étant de préférence choisi dans la liste citée précédemment.

On entend au sens de l'invention par "oligonucléotide" des chaînes contenant un ou plusieurs nucléotides, désoxynucléotides, ribonucléotides et/ou désoxyribonucléotides qui sont des unités monomériques se différenciant les unes des autres par la présence de bases qui peuvent être choisies parmi l'adénine, la guanine, la

cytosine, la thymidine ou l'uracile [voir Lehninger Biochimie, Flammarion Medecine Sciences, 2nde édition, p. 305-329].

Du fait de leur propriété à former des paires de base, les oligonucléotides sont largement utilisés en biologie moléculaire, par exemple comme linkers, comme sondes, ou encore pour former des construction avec de l'ADN.

Par ailleurs, les oligonucléotides peuvent aussi être utilisés sous forme de conjugués, c'est-à-dire couplés à une ou plusieurs autres molécules ayant des propriétés distinctes. A titre d'exemple, on peut citer le couplage d'un oligonucléotide avec un groupe chimique réactif, avec des groupes fluorescents ou chimioluminescents, ou encore avec des groupes susceptibles de favoriser les interactions intermoléculaires de façon à promouvoir l'entrée dans les cellules. De tels conjugués, décrits dans Bioconjugate Chemistry [John Goodchild, *Conjugates of Oligonucleotides and Modified Oligonucleotides : a Review of their Synthesis and properties*, Vol. 1, N°3, 1990, pp. 165-187], possèdent de nombreuses utilisations et avantages comme par exemple la capacité d'améliorer l'entrée de complexes dans les cellules, de diminuer le taux de dégradation par les nucléases, d'augmenter la stabilité du complexe concerné, de suivre le devenir des oligonucléotides dans un organisme etc...

Les oligonucléotides peuvent être obtenus selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier, et il est également possible de synthétiser des oligonucléotides modifiés selon les méthodes décrites dans Bioconjugate Chemistry, John Goodchild, *Conjugates of Oligonucleotides and Modified Oligonucleotides : a Review of their Synthesis and properties*, Vol. 1, N°3, 1990, pp. 165-187 ou dans Tetrahedron, Beaucage et al., *The Synthesis of Modified Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach and Their Application*, Vol. 49, N° 28, pp. 6123-6194, 1993.

On entend au sens de l'invention par "peptide" des chaînes contenant un ou plusieurs acides aminés liés entre eux par des liaisons de nature peptidique [Lehninger Biochimie, Flammarion Medecine Sciences, 2nde édition]. Il peut s'agir des 20 acides aminés "classiques", c'est-à-dire ceux trouvés couramment dans la composition des protéines (Alamine, Valine, Leucine, Isoleucine, Proline, Phenylalamine, Tryptophane,

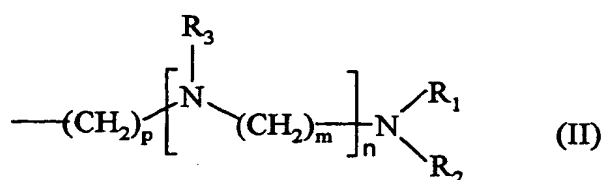
Méthionine, Acide Aspartique, Glutamine, Lysine, Arginine, Histidine, Glycine, Sérine, Thréonine, Cystéine, Tyrosine, Asparagine, Acide Glutamique), ou bien il peut aussi s'agir des acides aminés dits "rares" comme par exemple la 4-hydroxyproline, la desmosine, la 5-hydroxylysine, la N-méthyllysine, la 3-méthylhistidine, l'isodesmosine
 5 etc... Enfin, il peut également s'agir des acides aminés apparaissant dans différentes cellules ou divers tissus sous forme libre ou combinée et qui dérivent en général des acides α -aminés (par exemple la β -alamine, l'acide γ -aminobutyrique, l'homocystéine, l'ornithine, la canavanine, l'acide djenkalique, la β -cyanoalamine etc...).

Les peptides selon l'invention peuvent en outre être substitués au niveau de un ou
 10 plusieurs de leurs groupes fonctionnels, au niveau du carboxyle en α , de la fonction amine en α et/ou au niveau des groupes fonctionnels de la chaîne latérale de chacun des acides aminés. A titre d'exemple, on peut citer les substitutions par des groupements aliphatiques saturés ou insaturés, linéaires, ramifiés ou cycliques contenant 1 à 24 atomes de carbone, tels que par exemple des radicaux cholestéryle,
 15 arachidonyle ou rétinoyle, ou encore des groupements mono- ou polyaromatiques tels que par exemple des dérivés benzyloxycarbonyle, benzylester ou rhodaminyle substitués ou non. L'intérêt de telles substitutions s'inscrit dans le cadre de modification des propriétés chimiques et éventuellement biologiques desdits peptides, par exemple afin de les marquer.

20 On entend au sens de l'invention par "marqueur" tout agent permettant l'identification, par exemple par des techniques d'analyse comme la spectrométrie de fluorescence, la spectrométrie infrarouge, la résonnance magnétique nucléaire (RMN) etc..., de type biotine, rhodamine, folate... Cet agent marqueur peut également être une séquence peptidique ou pseudopeptidique linéaire ou cyclique comportant l'épitope
 25 Arg-Gly-Asp (Arginine-Glycine-Acide Aspartique) de reconnaissance des récepteurs primaires et/ou secondaires des protéines d'adhésion du type intégrines.

Au sens de l'invention, le polycation R est une molécule hydrophile linéaire ou ramifiée polycationique susceptible de s'associer avec l'acide nucléique, qui est polyanionique. On entend au sens de l'invention par association avec l'acide nucléique,

5 tout type de liaisons comme par exemple les liaisons covalentes, les interactions électrostatiques, ioniques, les ponts hydrogène etc... Par exemple, le polycation R peut être une molécule polycationique telle que définie dans les demandes de brevet WO 96/17823, WO 97/18185, WO 97/31935, PCT/FR98/01041, et plus généralement dans toute la littérature concernant des structures de lipides cationiques connue de l'homme du métier. Selon un aspect préféré de l'invention, R représente une polyamine de formule générale (II) :



dans laquelle :

- 10 - R₁, R₂ et R₃ représentent indépendamment les uns des autres un atome d'hydrogène ou un groupement (CH₂)_qNR'R'' avec q un nombre entier pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 inclus, ceci de manière indépendante entre les différents groupements R₁, R₂ et R₃,
- R' et R'' représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un
- 15 groupement (CH₂)_qNH₂ avec q défini comme précédemment, et
- m, n et p représentent indépendamment les uns des autres un nombre entier pouvant varier entre 0, 1, 2, 3, 4, 5 et 6 inclus, avec lorsque n est supérieur à 1, m pouvant prendre des valeurs différentes et R₃ des significations différentes au sein de la formule générale (II).
- 20 Préférentiellement, R représente une spermine ou une spermidine.

Une variante avantageuse de l'invention comprend les agents de transfert de l'invention sont définis par la formule générale (I) pour laquelle Y représente un atome d'hydrogène, et X représente un sucre tel que défini précédemment.

- 25 Un autre variante encore plus avantageuse de l'invention comprend les agents de transfert de formule générale (I) pour laquelle Y représente un atome d'hydrogène,

X représente un sucre, et R représente un polycation de formule générale (II) telle que définie précédemment.

Les termes x et y sont définis dans la formule générale (I) de façon à prendre toute valeur comprise entre 10 et 22 inclus. De préférence, x et y, indépendamment l'un de l'autre, sont compris entre 12 et 18 inclus. Plus préférentiellement, x et y valent, indépendamment l'un de l'autre, 14, 15, 16, 17 ou 18.

Il est entendu que la présente invention concerne également les isomères des produits de formule générale (I) lorsqu'ils existent, ainsi que leurs mélanges, ou leurs sels.

Notamment, les composés de l'invention peuvent se présenter sous forme de sels non toxiques et pharmaceutiquement acceptables. Ces sels non toxiques comprennent les sels avec les acides minéraux (par exemple l'acide chlorhydrique, sulfurique, bromhydrique, phosphorique, nitrique), avec les acides organiques (acide acétique, propionique, succinique, maléique, hydroxymaléique, benzoïque, fumarique, méthanesulfonique ou oxalique), avec les bases minérales (soude, potasse, lithine, chaux), ou avec les bases organiques (amines tertiaires comme la triéthylamine, la pipéridine, la benzylamine).

Selon l'invention, la préparation des produits de formule générale (I) s'effectue en mettant en oeuvre les étapes suivantes :

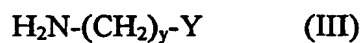
1) On prépare dans un premier temps une chaîne alkyle à x atomes de carbone (x étant défini comme précédemment dans la formule générale (I)), comportant une fonction hydroxy et une fonction ester, par ouverture d'une lactone correspondante. La réaction s'effectue généralement dans un alcool, à pH basique et à une température comprise entre -10°C et la température ambiante. A titre d'exemple, l'alcool peut être le méthanol ou l'éthanol.

2) Puis, on condense le sucre sur la chaîne alkyle bifonctionnelle obtenue à l'étape précédente. La condensation est avantageusement effectuée dans un solvant

chloré, comme par exemple le dichlorométhane ou le chloroforme, et en présence d'un acide de Lewis, à température comprise entre -5°C et 10°C. L'acide de Lewis peut par exemple être choisi parmi le chlorure d'étain, le chlorure de fer, l'acide p-toluène sulfonique (tsOH), le triméthylsilyltrifluorométhane sulfonique (TMStf), le trifluorure de bore étherate etc...[Kazunobu Toshima et al., *Recent Progress in O-glycosilation Methods and its Application to Natural Products Synthesis*, Chem. Rev. 1993, Vol. 93, pp. 1503-1531].

3) Dans un troisième temps, la fonction ester présente sur la chaîne bifonctionnelle est hydrolysée en fonction acide selon les méthodes connues. Notamment, on opère en milieu basique dans un alcool à haut point d'ébullition, à température comprise entre 50°C et la température de reflux du mélange réactionnel.

4) Puis, une chaîne alkylamine de formule générale (III) :



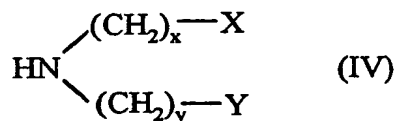
dans laquelle y et Y sont définis comme précédemment dans la formule générale (I), est couplée au composé obtenu à l'étape précédente, selon les méthodes de couplage peptidique classiques (Bodanski M., *Principles and Practices of Peptides Synthesis*, Ed. Springer-Verlag) ou par toute méthode analogue connue de l'homme du métier. Notamment, la réaction s'effectue généralement en présence d'une base non-nucléophile dans des solvants aprotiques convenables, à température comprise entre 0 et 100°C, le pH étant ajusté entre 9 et 11.

A titre d'exemple, le chloroforme, la diméthylformamide, la méthylpyrrolidone, l'acétonitrile, le dichlorométhane, le toluène ou le benzène peuvent être utilisés comme solvant.

Les bases non-nucléophiles employées sont préférentiellement des amines tertiaires, du carbonate de calcium ou du dicarbonate de sodium. Encore plus préférentiellement, les bases utilisées sont des amines tertiaires comme par exemple la triéthylamine (TEA) ou le N-éthyl-diisopropylamine.

Avantageusement, le couplage peptidique est effectué entre 0 et 50°C, et de préférence entre 10 et 30°C.

5) L'amide obtenue à l'étape précédente est ensuite réduite en amine. On opère pour cela selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier. Par exemple, on opère dans un solvant organique anhydre comme le tétrahydrofurane anhydre, par action d'hydrure de lithium aluminium LiAlH_4 . D'autres agents réducteurs pouvant être utilisés sont par exemple le borane, le borane dans le diméthylsulfure ($\text{BH}_3\text{-SMe}_2$), le borohydrure de sodium/tétrachlorure de titane ($\text{NaBH}_4, \text{TiCl}_4$), le chlorure d'oxyde de phosphore sur Zinc (POCl_3/Zn), le pentasulfure de phosphore (P_4S_{10}) sur nickel de Raney, etc... [Richard C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers Inc., 1989]. On peut également opérer par hydrogénation catalytique. Avantageusement, la réduction est effectuée par action d'hydrure de lithium aluminium LiAlH_4 , dans du tétrahydrofurane anhydre, à température de reflux du mélange. On obtient ainsi un composé de formule générale (IV) :



pour laquelle X, Y, x et y sont définis comme précédemment.

6) Enfin, dans une dernière étape, le dérivé acide correspondant au polycation R tel que défini précédemment, est couplé au composé de formule générale (IV) obtenu à l'étape précédente, selon les méthodes de couplage peptidique classiques (Bodanski M., *Principles and Practices of Peptides Synthesis*, Ed. Springe-Verlag) ou par toute méthode analogue connue de l'homme du métier.

Notamment, la réaction s'effectue généralement en présence d'une base non-nucléophile dans des solvants aprotiques convenables, à température comprise entre 0 et 100°C, le pH étant ajusté entre 9 et 11.

A titre d'exemple, le chloroforme, la diméthylformamide, la méthylpyrrolidone, l'acétonitrile, le dichlorométhane, le toluène ou le benzène peuvent être utilisés comme solvant.

Les bases non-nucléophiles employées sont préférentiellement des amines tertiaires, du carbonate de calcium ou du dicarbonate de sodium. Encore plus préférentiellement, les bases utilisées sont des amines tertiaires comme par exemple la triéthylamine (TEA) ou le N-éthyl-diisopropylamine.

- 5 Avantageusement, le couplage peptidique est effectué entre 0 et 50°C, et de préférence entre 10 et 30°C.

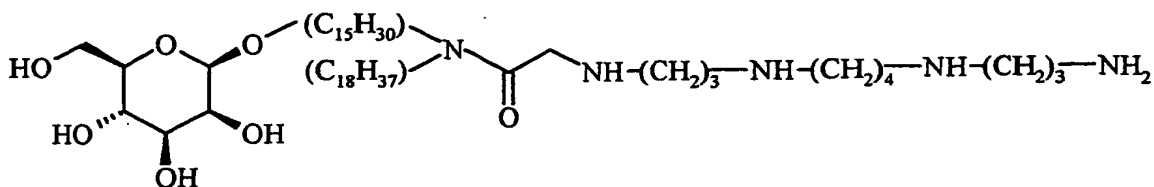
Les dérivés acides correspondant au polycation sont disponibles commercialement.

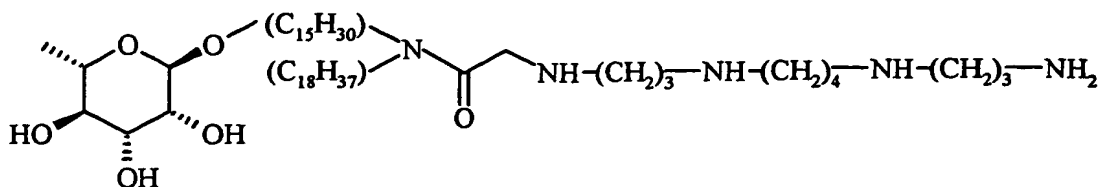
- 10 Naturellement, lorsque les substituants du sucre et/ou du polycation peuvent interférer avec la réaction, il est préférable de les protéger préalablement avec des radicaux compatibles et pouvant être mis en place et éliminés sans toucher au reste de la molécule. On opère pour cela selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier, et notamment selon les méthodes décrites dans T.W. GREENE, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd Edition, Wiley-Interscience, dans McOMIE, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press (1973), ou dans Philip J
- 15 Kocienski, *Protecting Groups*, Thieme.

Par ailleurs, chaque étape du procédé de préparation peut être suivie, le cas échéant, des étapes de séparation et de purification du composé obtenu selon les méthodes connues de l'homme du métier.

- 20 A titre d'exemple illustratif d'agents de transfert d'acides nucléiques avantageux selon l'invention, on peut citer les composés suivants :

Composé 1



Composé 2

Un autre objet de l'invention concerne les compositions comprenant un agent de transfert d'acides nucléiques tel que défini ci-avant, et un acide nucléique. Les quantités respectives de chaque composant peut être ajusté aisément par l'homme du métier en fonction de l'agent de transfert utilisé, de l'acide nucléique, et des applications recherchées (notamment du type de cellules à transfecter).

On entend au sens de l'invention par "acide nucléique" aussi bien un acide désoxyribonucléique qu'un acide ribonucléique. Il peut s'agir de séquences naturelles ou artificielles, et notamment d'ADN génomique (ADNg), d'ADN complémentaire (ADNc), d'ARN messager (ARNm), d'ARN de transfert (ARNt), d'ARN ribosomique (ARNr), de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques, d'oligonucléotides modifiés ou non. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc... Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Ils peuvent être modifiés chimiquement.

Concernant plus particulièrement les acides désoxyribonucléiques, ils peuvent être simple ou double brin de même que des oligonucléotides courts ou des séquences plus longues. En particulier, les acides nucléiques sont avantageusement constitués par des plasmides, des vecteurs, des épisomes, des cassettes d'expression, etc... Ces acides désoxyribonucléiques peuvent porter une origine de répllication fonctionnelle ou non dans la cellule cible, un ou plusieurs gènes marqueurs, des séquences régulatrices de la transcription ou de la répllication, des gènes d'intérêt thérapeutique, des séquences

antisens modifiées ou non, des régions de liaison à d'autres composants cellulaires, etc...

De préférence, l'acide nucléique comprend un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique sous contrôle de séquences de régulation, par exemple un ou plusieurs promoteurs et un terminateur transcriptionnel actifs dans les cellules cibles.

Au sens de l'invention, on entend par gène d'intérêt thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit protéique ainsi codé peut être notamment une protéine ou un peptide. Ce produit protéique peut être exogène homologue ou endogène vis-à-vis de la cellule cible, c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie. Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène d'intérêt thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc... Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc... (FR 92/03120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques (BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc...) les apolipoprotéines (ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc..., FR 93/05125), la dystrophine ou une minidystrophine (FR 91/11947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs (p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc..., FR 93/04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la

coagulation (Facteurs VII, VIII, IX), les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), les gènes de l'hémoglobine ou d'autres transporteurs protéiques, les enzymes du métabolisme, catabolisme etc...

- 5 L'acide nucléique d'intérêt thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par exemple, être transcrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique
- 10 décrite dans le brevet EP 140 308. Les gènes thérapeutiques comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

- Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme
- 15 ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet la réalisation soit de vaccins soit de traitements immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B
- 20 (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, du "syncytia forming virus", d'autres virus ou encore de peptides antigéniques spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

- Préférentiellement, l'acide nucléique comprend également des séquences permettant l'expression du gène d'intérêt thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide antigénique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui
- 25 sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes

eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc... En outre, ces séquences
5 d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc... Il peut aussi s'agir de promoteur, inductible ou répressible.

Par ailleurs, l'acide nucléique peut également comporter, en particulier en amont du gène d'intérêt thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence
10 signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle. L'acide nucléique peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé vers un compartiment particulier de la cellule.

Les compositions selon l'invention peuvent en outre comporter un ou
15 plusieurs adjuvants capables de s'associer aux complexes agent de transfert/acide nucléique et d'en améliorer le pouvoir transfectant. Dans un autre mode de mise en oeuvre, la présente invention concerne donc des compositions comprenant un acide nucléique, un agent de transfert d'acides nucléiques tel que défini ci-avant et au moins un adjuvant capable de s'associer aux complexes agent de transfert/acide nucléique et
20 d'en améliorer le pouvoir transfectant. La présence de ce type d'adjuvant (lipides, peptides ou protéines par exemple) peut permettre avantageusement d'augmenter le pouvoir transfectant des composés. Dans cette optique, les compositions de l'invention peuvent comprendre à titre d'adjuvant, un ou plusieurs lipides neutres.

Plus préférentiellement, les lipides neutres utilisés dans le cadre de la présente
25 invention sont des lipides à deux chaînes grasses. De manière particulièrement avantageuse, on utilise des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologiques. Il peuvent être choisis plus particulièrement parmi la dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE),

l'oléoylpalmitoylphosphatidyléthanamine (POPE), les distéaroyl, -palmitoyl, -mirystoylphosphatidyléthanamines ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois, les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérébrosides (tels que notamment les galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

Ces différents lipides peuvent être obtenus soit par synthèse, soit par extraction à partir d'organes (exemple : le cerveau) ou d'oeufs, par des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. En particulier, l'extraction des lipides naturels peut être réalisée au moyen de solvants organiques (voir également Lehninger, Biochemistry).

Plus récemment, la demanderesse a démontré qu'il était également particulièrement avantageux d'employer à titre d'adjuvant, un composé intervenant ou non directement au niveau de la condensation dudit acide nucléique, tels que ceux décrits dans la demande de brevet WO 96/25508. La présence d'un tel composé, au sein d'une composition selon l'invention, permet de diminuer la quantité d'agent transfectant, avec les conséquences bénéfiques qui en découlent sur le plan toxicologique, sans porter un préjudice quelconque à l'activité transfectante. Par composé intervenant au niveau de la condensation de l'acide nucléique, on entend définir un composé compactant, directement ou non, l'acide nucléique. Plus précisément, ce composé peut soit agir directement au niveau de l'acide nucléique à transfecter soit intervenir au niveau d'un composé annexe qui lui est directement impliqué dans la condensation de cet acide nucléique. De préférence, il agit directement au niveau de l'acide nucléique. Notamment, l'agent précompactant peut être tout polycation, par exemple la polylysine. Selon un mode de réalisation préféré, l'agent intervenant au niveau de la condensation de l'acide nucléique dérive en tout ou partie d'une protamine, d'une histone, ou d'une nucléoline et/ou de l'un de leurs dérivés. Un tel agent peut également être constitué, en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA), le nombre des motifs pouvant

varier entre 2 et 10. Dans la structure du composé selon l'invention, ces motifs peuvent être répétés de manière continue ou non. C'est ainsi qu'ils peuvent être séparés par des liens de nature biochimique, par exemple par un ou plusieurs acides aminés, ou de nature chimique.

- 5 Préférentiellement, les compositions de l'invention comprennent de 0,01 à 20 équivalents d'adjuvant pour un équivalent d'acide nucléique en mol/mol et, plus préférentiellement, de 0,5 à 5.

 Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, les compositions selon la présente invention comprennent en outre un élément de ciblage permettant
10 d'orienter le transfert de l'acide nucléique. Cet élément de ciblage peut être un élément de ciblage extracellulaire permettant d'orienter le transfert de l'ADN vers certains, types cellulaires ou certains tissus souhaités (cellules tumorales, cellules hépatiques, cellules hématopoïétiques...). Il peut également s'agir d'un élément de ciblage intracellulaire permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique vers certains
15 compartiments cellulaires privilégiés (mitochondries, noyau etc...). L'élément de ciblage peut être lié à l'agent de transfert d'acides nucléiques selon l'invention, ou également à l'acide nucléique comme cela a été précisé précédemment. Lorsque l'élément de ciblage est lié à l'agent de transfert d'acides nucléiques de formule générale (I), celui-ci est de préférence incorporé au niveau du substituant X ou Y.

- 20 Parmi les éléments de ciblage utilisables dans le cadre de l'invention, on peut citer les sucres, les peptides, les protéines, les oligonucléotides, les lipides, les neuromédiateurs, les hormones, les vitamines ou leurs dérivés. Préférentiellement, il s'agit de sucres, de peptides ou de protéines tels que des anticorps ou des fragments d'anticorps, des ligands de récepteurs cellulaires ou des fragments de ceux-ci, des
25 récepteurs ou des fragments de récepteurs, etc... En particulier, il peut s'agir de ligands de récepteurs de facteurs de croissance, de récepteurs de cytokines, de récepteurs de type lectines cellulaires, ou de ligands à séquence RGD avec une affinité pour les récepteurs de protéines d'adhésion comme les intégrines. On peut également citer les

récepteurs de la transferrine, des HDL et des LDL, ou le transporteur du folate. L'élément de ciblage peut également être un sucre permettant de cibler des lectines tels que les récepteurs aux asialoglycoprotéines ou aux sialydés tel que le sialyl Lewis X, ou encore un fragment Fab d'anticorps, ou un anticorps simple chaîne (ScFv).

- 5 L'association des éléments de ciblage aux complexes nucléolipidiques peut être effectuée par toute technique connue de l'homme du métier, par exemple par couplage à une partie hydrophobe ou à une partie qui interagit avec l'acide nucléique de l'agent de transfert selon l'invention, ou encore à un groupement qui interagit avec l'agent de transfert selon l'invention ou avec l'acide nucléique. Les interactions en
- 10 question peuvent être, selon un mode préféré, de nature ionique ou covalente.

- L'invention a également pour objet l'utilisation des composés tels que définis ci-avant pour le transfert de polynucléotides (et plus généralement de polyanions) dans les cellules *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*. Plus précisément, la présente invention a pour objet l'utilisation des composés tels que définis ci-avant pour la préparation d'un
- 15 médicament destiné à traiter les maladies résultant d'une déficience en un produit protéique ou nucléique. Le polynucléotide contenu dans ledit médicament code ledit produit protéique ou nucléique, ou constitue ledit produit nucléique, apte à corriger lesdites maladies *in vivo* ou *ex vivo*.

- Pour des utilisations *in vivo*, par exemple en thérapie ou pour l'étude de la
- 20 régulation de gènes ou la création de modèles animaux de pathologies, les compositions selon l'invention peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, cutanée, orale, rectale, vaginale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, intratrachéale, intrapéritonéale, etc... De préférence, les compositions de l'invention contiennent un
- 25 véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour une administration par voie topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par

addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses d'acides nucléiques utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la

5 pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. En ce qui concerne plus particulièrement le mode d'administration, il peut s'agir soit d'une injection directe dans les tissus, par exemple au niveau des tumeurs, ou dans les voies circulatoires, soit d'un traitement de cellules en culture suivi de leur réimplantation *in vivo*, par injection ou greffe. Les tissus concernés dans le cadre de la

10 présente invention sont par exemple les muscles, la peau, le cerveau, les poumons, le foie, la rate, la moelle osseuse, le thymus, le coeur, la lymphe, le sang, les os, les cartilages, le pancréas, les reins, la vessie, l'estomac, les intestins, les testicules, les ovaires, le rectum, le système nerveux, les yeux, les glandes, les tissus conjonctifs, etc...

15 L'invention concerne en outre une méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules comprenant les étapes suivantes :

(1) la mise en contact de l'acide nucléique avec un agent de transfert tel que défini ci-avant, pour former un complexe, et

(2) la mise en contact des cellules avec le complexe formé en (1).

20 La mise en contact des cellules avec le complexe peut être réalisée par incubation des cellules avec ledit complexe (pour des utilisations *in vitro* ou *ex vivo*), ou par injection du complexe dans un organisme (pour des utilisations *in vivo*). L'incubation est réalisée de préférence en présence de par exemple de 0,01 à 1000 μg d'acide nucléique pour 10^6 cellules. Pour une administration *in vivo*, des doses d'acide

25 nucléique allant de 0,01 à 10 mg peuvent par exemple être utilisées.

Dans le cas où les compositions de l'invention contiennent en outre un ou plusieurs adjuvants tels que définis précédemment, le ou les adjuvants sont préalablement mélangés à l'agent de transfert selon l'invention et/ou à l'acide nucléique.

La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement avantageuse pour le transfert d'acides nucléiques *in vivo*, notamment pour le traitement de maladies, comprenant l'administration *in vivo* ou *in vitro* d'un acide nucléique codant pour une protéine ou pouvant être transcrit en un acide nucléique apte à corriger ladite
5 maladie, ledit acide nucléique étant associé à un composé de formule générale (I) dans les conditions définies ci-avant.

Les agents de transfert d'acides nucléiques de l'invention sont particulièrement utilisables pour le transfert d'acides nucléiques dans des cellules primaires ou dans des lignées établies. Il peut s'agir de cellules fibroblastiques, musculaires, nerveuses
10 (neurones, astrocytes, cellules gliales), hépatiques, hématopoiétiques (lymphocytes, CD34, dendritiques, etc...), épithéliales etc..., sous forme différenciées ou pluripotentes (précurseurs).

Outre les dispositions qui précèdent, la présente invention comprend également d'autres caractéristiques et avantages qui ressortiront des exemples et figures
15 qui suivent, et qui doivent être considérés comme illustrant l'invention sans en limiter la portée. Notamment, la demanderesse propose à titre non-limitatif divers protocoles opératoires ainsi que des intermédiaires réactionnels susceptibles d'être mis en oeuvre pour préparer les agents de transfert de formule générale (I). Bien entendu, il est à la portée de l'homme du métier de s'inspirer de ces protocoles ou produits intermédiaires
20 pour mettre au point des procédés analogues en vue de conduire à ces mêmes composés. Il appartient également à l'homme du métier de s'inspirer des procédés de synthèse décrits dans les différentes demandes de brevet précédemment citée pour la synthèse du polycation R compris dans la formule générale (I) (WO 96/17823, WO 97/18185, WO 97/31935 ...).

25 FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique du plasmide pXL2774 utilisé dans les expériences de transfert d'ADN dans les cellules.

Figure 2 : Activité de transfert de gène *in vitro* dans des cellules HeLa des complexes formés à partir du composé 2 selon l'invention sans co-lipide, ou bien en présence de cholestérol et en présence de DOPE comme co-lipides. L'axe des ordonnées représente l'expression de la luciférase en pg/puit. L'axe des abscisses indique le rapport lipide/ADN en nmole/ μ g d'ADN.

Figure 3 : Activité de transfert de gène *in vivo* après injection directe dans le muscle antérieur du tibia de souris de complexes formés à partir du composé 2 selon la présente invention en présence de DOPE (1 : 1). L'axe des ordonnées indique l'expression de la luciférase en pg/muscle. L'axe des abscisses indique le rapport composé 2/ADN en nmoles/ μ g d'ADN.

EXEMPLES

Matériel et méthodes

a) Matériel

- Les polyamines de départ, comme la spermidine, la spermine, le tris-(2-aminoéthyle)amine, la phénylènediamine, les diaminoalcane etc..., sont disponibles commercialement ou elles peuvent être synthétisée par des méthodes classiques (par exemple par cyanoéthylation d'amines disponibles dans le commerce pour obtenir des amines branchées)
- de nombreux composés comme par exemple la triéthylamine, l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium (BOP), le chloroformate de benzyle, le 11-bromoundécanol, etc... sont également des produits commerciaux.
- L'amberlite IR 120 est une résine échangeuse d'ions commerciale (catalogue BDH).
- Le diméthylsulfoxyde (DMSO), traité préalablement à l'hydroxyde de potassium, a été distillé sur hydrure de calcium puis stocké sur tamis moléculaire 4 Å.
- Le dichlorométhane a été distillé sur le pentoxyde de phosphore puis stocké sur tamis moléculaire 4 Å.
- Le tétrahydrofuranne (THF) a été distillé sur sodium en présence de benzophénone.

- Pour les réactions nécessitant des conditions anhydre, toute la verrerie est séchée à la flamme sous courant d'azote.

b) Méthodes

- Analyses spectroscopiques

- 5 Les spectres de résonnance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker MSL 30 à la fréquence de 300 MHz pour le proton et 75 MHz pour le carbone. Tous les déplacements chimiques sont reportés en ppm par rapport à la fréquence du tétraméthylsilane (TMS). Les spectres ont été enregistrés en utilisant soit le TMS soit le signal résiduel du solvant comme référence interne. La multiplicité
- 10 des signaux est désignée par les abbréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet) et m (multiplet).

- Techniques de chromatographie

- La cinétique des réactions a été suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) avec un gel de silice contenant un indicateur fluorescent (Merck Silicagel 60 F254) comme support. Les chromatogrammes ont été révélés par pulvérisation d'une
- 15 solution alcoolique d'anisaldéhyde.
- Toutes les chromatographies sur colonne ont été réalisées sous pression d'air comprimé avec du silicagel 60 comme phase stationnaire (0,05-0,02 mm). La phase mobile employée diffère selon le type de synthèse (chromatographie moyenne
- 20 pression).
- Les analyses CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) sont réalisées sur un appareil Waters LC 4000 équipé d'une colonne analytique de type C4 commercialisée par Applied Biosystem ("Brownlee Columns" en acier inoxydable de 3 cm de longueur et 0,46 cm de diamètre) et d'un détecteur "Waters 486" à 220 nm.
- 25 La phase stationnaire est de l'aquapore butyl 7 microns, et les phases mobiles sont l'eau déminéralisée (2500 cm³) ou l'acétonitrile (2500 cm³) additionné d'acide trifluoroacétique (2,5 cm³). Le débit est de 1 ml par minute.

A\ SYNTHÈSE DES AGENTS DE TRANSFECTION

Exemple 1 : synthèse du 1'-[-(3-[4-(3-amino-propyl-amino)-butyl-amino]-méthylène-carbamoyl)-15-pentadécanyl-16-octadécyl]-β-D-mannopyrannose (Composé 1)

5 a) Synthèse du 1-ol pentadécanoate de méthyle

A 10 g de pentadécalactone (41,60 mmol) dans 41,60 cm³ de méthanol, on ajoute 6,66 cm³ de méthylate de sodium 2N (13,31 mmol) à 0°C.

Après 9 heures, on ajoute 9,24 cm³ d'acide acétique et on laisse agir pendant 15 minutes. Puis on évapore la solution sous vide à sec, on reprend ensuite par du dichlorométhane, et on effectue un lavage au bicarbonate de sodium. On sèche la phase organique obtenue par du sulfate de magnésium et on évapore le solvant au rotavapor. La purification se fait dans un mélange hexane/acétate d'éthyle 6:4. On obtient le 1-ol-pentadécanoate de méthyle avec un rendement de 80 %.

¹H RMN (CDCl₃) : δ (ppm) 1,26 (m, 12H, (CH₂)₁₀), 1,5-1,6 (m, 4H, H-2 et H-13), 2,30 (t, 2H, J = 7.60 Hz, H-14), 3,64 (t, 1H, J = 5,84 Hz, H-1), 3,67 (s, 3H, H-16).

b) Synthèse du 1'-[pentadécan-15-oate de méthyl]-2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-mannopyrannose

A 0°C, on ajoute 5,26 cm³ de chlorure d'étain (44,94 mmol) à 8,72 g de mannose peracétylé (22,47 mmol) dans 56 cm³ de dichlorométhane pendant 30 minutes. Puis on ajoute 7,34 g de 1-ol pentadécanoate de méthyle précédemment obtenu en a) (26,96 mmol). Après 2 heures, le mélange réactionnel est dilué par de l'éther éthylique et on verse dans une solution d'hydrogénophosphate de sodium (NaHPO₄). Les phases aqueuses sont extraites avec du diéthyléther et les phases organiques sont successivement lavées par une solution de carbonate de sodium, de la saumure, puis séchées sur sulfate de magnésium. Le produit obtenu après évaporation sous vide à sec est purifié par chromatographie moyenne pression dans un mélange heptane/acétate d'éthyle 7:3. Le rendement est de 53 %.

¹H RMN (CDCl₃) : δ (ppm) 1,26 (m, 12H, (CH₂)₁₀), 1,59 (m, 4H, H-2 et H-13), 2,01, 2,05, 2,12 et 2,17 (s, 3H, OCOCH₃), 2,29 (t, 2H, J= 7,62 Hz, H-14), 3,40 (m, 1H, J= 7,89 Hz, H-1a), 3,66 (m, 1H, J= 7,89 Hz, H-1b), 3,67 (s, 3H, H-16), 3,97-4,05 (m, 2H, H-4' et H-5'), 4,1 (dd, 1H, J= 5,57 Hz et 12,32 Hz, H-6'a), 4,29 (dd, 1H, J= 5,57 Hz et 12,32 Hz, H-6'b), 4,8 (d, 1H, J= 1,85 Hz, H-1'), 5,23 (dd, 1H, J= 1,85 Hz et 3,23 Hz, H-2'), 5,35 (dd, 1H, J= 9,97 Hz et 3,23 Hz, H-3').

c) Synthèse du 1'-[pentadécan-15-oate de méthyl]-β-D-mannopyrannose

On traite 3,63 g de produit obtenu à l'étape précédente (6,01 mmol) en solution dans 12 cm³ de méthanol par 3 cm³ de méthylate de sodium 2N (6,01 mmol). Lorsque la
10 reaction terminée, on neutralise cette dernière avec de l'Amberlite IR120 (1 équivalent poids/volume), on filtre et on évapore à sec sous vide.

¹H RMN (CDCl₃) : δ (ppm) 1,28 (m, 12H, (CH₂)₁₀), 1,59 (m, 4H, H-2 et H-13), 2,34 (t, 2H, J= 7,62 Hz, H-14), 3,41 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1a), 3,74 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1b), 3,67 (s, 3H, H-16), 3,5-3,82 (m, 6H, H-2', H-3', H-4', H-5' et H-6'), 4,75
15 (d, 1H, J= 1,72 Hz, H-1').

d) Synthèse du 1'-[pentadécan-15-oate de méthyl]-2',3',4',6'-tétra-O-benzyl-β-D-mannopyrannose

A 2 g (4,56 mmol) de produit obtenu à l'étape précédente c) en solution dans 20 cm³ de diméthylformamide (DMF) anhydre, on ajoute successivement 4,54 g d'iodure de potassium (27,36 mmol), 1,09 g d'hydruure de sodium 60% (27,36 mmol) et 3,25 cm³
20 de bromure de benzyle (27,36 mmol). Après 12 heures, on ajoute 18,24 cm³ d'une solution saturée de chlorure d'ammonium, et on laisse agir pendant 10 minutes. Puis, on dilue avec de l'eau et on extrait la phase organique par de l'acétate d'éthyle. Celle-ci est ensuite lavée avec de l'eau et de la saumure, et est finalement séchée par du sulfate de magnésium. On effectue par ailleurs un lavage supplémentaire par une
25 solution saturée de thiosulfate de sodium afin d'éliminer les ions iodures. On évapore sous vide et on purifie l'huile résultante dans un mélange heptane/acétate d'éthyle 9:1. Le produit est obtenu avec un rendement de 60 %.

¹H RMN (CDCl₃) : d (ppm) 1,28 (m, 14H, (CH₂)₁₀), 1,49 (m, 2H, H-2), 1,59 (m, 2H, H-13), 2,31 (t, 2H, J= 7,62 Hz, H-14), 3,34 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1a), 3,63 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1b), 3,67 (s, 3H, H-16), 3,75 (m, 1H, J= 8,97 Hz et 6,21 Hz, H-5'), 3,78 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 3,90 (dd, 1H, J= 6,21 Hz et J= 11,82 Hz, H-6'a), 3,97 (dd, 1H, J= 6,21 Hz et J= 11,82 Hz, H-6'b), 4,07 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,52 (dd, J= 2,91 Hz et 7,83 Hz, H-3'), 4,57 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,63 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,69 (dd, 1H, J= 2,52 Hz et 2,91 Hz, H-2'), 4,74 (1H, J= 2,52 Hz, H-1'), 4,85 (dd, 1H, J= 7,83 Hz et 8,97 Hz, H-4'), , 7,35 (m, 18H, C₆H₆).

10 **e) Synthèse du 1'-[pentadécan-15-oïque]-2',3',4',6'-tétra-O-benzyl-β-D-mannopyrannose**

A 0,50 g (0,73 mmol) de produit obtenu à l'étape précédente d) en solution dans 7 cm³ de méthanol, on ajoute 4,68 cm³ d'une solution de soude 25 %. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 30 minutes. Puis, on neutralise le mélange à froid avec une solution d'acide chlorhydrique 5 %. On extrait la phase organique par de l'acétate d'éthyle, et on évapore à sec sous vide. La purification se fait dans un mélange heptane/acétate d'éthyle 4:6. Le produit est obtenu avec un rendement de 62 %.

20 ¹H RMN (CDCl₃) : d (ppm) 1,28 (m, 14H, (CH₂)₁₀), 1,49 (m, 2H, H-2), 1,59 (m, 2H, H-13), 2,34 (t, 2H, J= 7,62 Hz, H-14), 3,34 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1a), 3,63 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1b), 3,75 (m, 1H, J= 8,97 Hz et 6,21 Hz, H-5'), 3,78 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 3,90 (dd, 1H, J= 6,21 Hz et J= 11,82 Hz, H-6'a), 3,97 (dd, 1H, J= 6,21 Hz et J= 11,82 Hz, H-6'b), 4,07 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,52 (dd, J= 2,91 Hz et 7,83 Hz, H-3'), 4,57 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,63 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,69 (dd, 1H, J= 2,52 Hz et 2,91 Hz, H-2'), 4,74 (1H, J= 2,52 Hz, H-1'), 4,85 (dd, 1H, J= 7,83 Hz et 8,97 Hz, H-4'), , 7,35 (m, 18H, C₆H₆).

25 **f) Synthèse du 1'-[pentadécan-15-carbamoyl-16-octadécyl]-2',3',4',6'-tétra-O-benzyl-β-D-mannopyrannose**

A 0,29 g (0,37 mmol) d'une solution de produit obtenu à l'étape précédente e), en solution dans 5 cm³ de chloroforme, on ajoute successivement du 0,23 g de BOP

(0,52 mmol), 0,21 cm³ de diisopropyléthylamine (1,48 mmol) et 0,12 g d'octadécylamine (0,44 mmol). Lorsque la réaction est achevée, on dilue par du dichlorométhane et on effectue un lavage par de l'eau. Puis, on sèche par du sulfate de magnésium et on évapore à sec sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie moyenne pression dans un mélange heptane/acétate d'éthyle 6:4. Le produit est obtenu avec un rendement de 98 %.

¹H RMN (CDCl₃) : δ (ppm) 0,88 (t, 3H, J= 6,36 Hz, H-33), 1,27 (m, 14H, (CH₂)₂₅), 1,47 (m, 4H, H-2 et H-17), 1,58 (m, 2H, H-13), 2,13 (t, 2H, J= 7,92 Hz, H-14), 3,23 (m, 2H, H-16), 3,34 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1a), 3,63 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1b), 3,75 (m, 1H, J= 8,97 Hz et 6,21 Hz, H-5'), 3,78 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 3,90 (dd, 1H, J= 6,21 Hz et J= 11,82 Hz, H-6'a), 3,97 (dd, 1H, J= 6,21 Hz et J= 11,82 Hz, H-6'b), 4,07 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,52 (dd, J= 2,91 Hz et 7,83 Hz, H-3'), 4,57 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,63 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,69 (dd, 1H, J= 2,52 Hz et 2,91 Hz, H-2'), 4,74 (1H, J= 2,52 Hz, H-1'), 4,85 (dd, 1H, J= 7,83 Hz et 8,97 Hz, H-4'), 5,37 (bande, 1H, HNCO), 7,35 (m, 18H, C₆H₆).

g) Synthèse du 1'-[pentadécan-15-amino-16-octadécyl]-2',3',4',6'-tétra-O-benzyl-β-D-mannopyrannose

A 0,77 g (0,75 mmol) de produit obtenu à l'étape précédente f), dans 15 cm³ de tétrahydrofuranne (THF) anhydre, on ajoute 0,056 g d'hydruure de lithium aluminium AlLiH₄ (1,50 mmol). On chauffe à reflux pendant 10 heures. Puis, le mélange réactionnel est refroidi dans un bain de glace et on ajoute 56 µl d'eau, puis 112 µl de soude 2N après 10 minutes, et enfin encore 56 µl d'eau 10 minutes plus tard. On filtre et on évapore à sec sous vide. Le produit obtenu est purifié dans un mélange de dichlorométhane/méthanol/ammoniac 28 % 9:2:0,5. Le produit est obtenu avec un rendement de 86 %.

¹H RMN (CDCl₃) : δ (ppm) 0,88 (t, 3H, J= 6,36 Hz, H-33), 1,27 (m, 14H, (CH₂)₂₅), 1,4-1,6 (m, 9H, H-2, H-17, H-14, H-17et NH), 2,57 (t, 4H, J= 7,92 Hz, H-15 et H-16), 3,34 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1a), 3,63 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1b), 3,75 (m, 1H, J= 8,97 Hz et 6,21 Hz, H-5'), 3,78 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 3,90 (dd, 1H, J= 6,21

Hz et $J = 11,82$ Hz, H-6'a), 3,97 (dd, 1H, $J = 6,21$ Hz et $J = 11,82$ Hz, H-6'b), 4,07 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_6$), 4,52 (dd, $J = 2,91$ Hz et 7,83 Hz, H-3'), 4,57 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_6$), 4,63 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_6$), 4,69 (dd, 1H, $J = 2,52$ Hz et 2,91 Hz, H-2'), 4,74 (1H, $J = 2,52$ Hz, H-1'), 4,85 (dd, 1H, $J = 7,83$ Hz et 8,97 Hz, H-4'), 7,35 (m, 18H, C_6H_6).

5 **h) Synthèse du 1'-[-(3-[4-(3-tert-butoxycarbonyl-amino-propyl-tert-butoxycarbonyl-amino)-butyl-tert-butoxycarbonyl-amino]-méthylène-carbamoyl)-15-pentadécanyl-16-octadécyl]-2',3',4',6'-tétra-O-benzyl-β-D-mannopyrannose**

A 0,63 g (0,61 mmol) d'une solution de produit obtenu précédemment à l'étape g),
 10 dans 10 cm^3 de chloroforme, on ajoute successivement 0,38 g de BOP (0,85 mmol),
 0,425 cm^3 de diisopropyléthylamine (2,44 mmol) et 0,48 g d'acide 3-[4-(3-tert-butoxycarbonyl-amino-propyl-tert-butoxycarbonyl-amino)-butyl-tert-butoxycarbonyl-amino]-acétique (FRM 375) (0,73 mmol). Au bout de 4 heures, on dilue par du dichlorométhane et on effectue un lavage à l'eau. On sèche par du sulfate de
 15 magnésium et on évapore à sec sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie moyenne pression dans un mélange heptane/acétate d'éthyle 6:4. Le produit est obtenu avec un rendement de 80 %.

^1H RMN (CDCl_3) : δ (ppm) 0,88 (t, 3H, $J = 6,36$ Hz, H-33), 1,27 (m, 14H, $(\text{CH}_2)_{25}$), 1,4-1,6 (m, 17H, H-2, H-17, H-14, H-17, H-37, H-40, H-41 et H-44), 1,46
 20 (m, 36H, Boc), 2,8-2,9 (m, 6H, H-15, H-16 et H-35), 3,09-3,33 (m, 12H, H-36, H-38, H-39, H-42, H-43 et H-45), 3,34 (m, 1H, $J = 6,71$ Hz, H-1a), 3,63 (m, 1H, $J = 6,71$ Hz, H-1b), 3,75 (m, 1H, $J = 8,97$ Hz et 6,21 Hz, H-5'), 3,78 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_6$), 3,90 (dd, 1H, $J = 6,21$ Hz et $J = 11,82$ Hz, H-6'a), 3,97 (dd, 1H, $J = 6,21$ Hz et $J = 11,82$ Hz, H-6'b), 4,07 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_6$), 4,52 (dd, $J = 2,91$ Hz et 7,83 Hz, H-3'), 4,57 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_6$), 4,63 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_6$), 4,69 (dd, 1H, $J = 2,52$ Hz et 2,91 Hz, H-2'),
 25 4,74 (1H, $J = 2,52$ Hz, H-1'), 4,85 (dd, 1H, $J = 7,83$ Hz et 8,97 Hz, H-4'), 7,35 (m, 18H, C_6H_6).

i) Synthèse du 1'-[3-[4-(3-tert-butoxycarbonyl-amino-propyl-tert-butoxycarbonyl-amino)-butyl-tert-butoxycarbonyl-amino]-méthylène-carbamoyl]-15-pentadécanyl-16-octadécyl]-β-D-mannopyrannose

5 A 0,63 g (0,38 mmol) de produit obtenu à l'étape précédente h), dans 5 cm³ de méthanol, on ajoute 10 % de palladium sur charbon (0,027 g). La solution est agitée sous pression d'hydrogène à température ambiante. Au bout de 6 heures, on filtre puis on évapore à sec sous vide. La réaction est quantitative.

10 ¹H RMN (CD₃OD) : δ (ppm) 0,88 (t, 3H, J= 6,36 Hz, H-33), 1,27 (m, 14H, (CH₂)₂₅), 1,4-1,6 (m, 17H, H-2, H-17, H-14, H-17, H-37, H-40, H-41 et H-44), 1,46 (m, 36H, Boc), 2,8-2,9 (m, 6H, H-15, H-16 et H-35), 3,09-3,33 (m, 12H, H-36, H-38, H-39, H-42, H-43 et H-45), 3,34 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1a), 3,5-3,82 (m, 6H, H-2', H-3', H-4', H-5' et H-6'), 3,63 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1b), 4,72 (1H, J= 2,52 Hz, H-1').

15 j) Synthèse du 1'-[3-[4-(3-amino-propyl-amino)-butyl-amino]-méthylène-carbamoyl]-15-pentadécanyl-16-octadécyl]-β-D-mannopyrannose (composé 1)

A 0,37 g (0,28 mmol) de produit obtenu à l'étape précédente i), on ajoute 21,50 cm³ de tétrahydrofurane (THF) distillé. Après 1 heure, le mélange réactionnel est concentré à froid et lyophilisé. On vérifie le degré de pureté du produit en solution dans du méthanol par CLHP comme décrit dans la partie "Matériel et Méthodes".

20 ¹H RMN (CD₃OD) : δ (ppm) 0,88 (t, 3H, J= 6,36 Hz, H-33), 1,27 (m, 14H, (CH₂)₂₅), 1,4-1,6 (m, 17H, H-2, H-17, H-14, H-17, H-37, H-40, H-41 et H-44), 1,46 (m, 36H, Boc), 2,8-2,9 (m, 6H, H-15, H-16 et H-35), 2,92 (m, 2H, H-45), 2,92-3,17 (m, 12H, H-36, H-38, H-39, H-42, H-43), 3,34 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1a), 3,5-3,82 (m, 6H, H-2', H-3', H-4', H-5' et H-6'), 3,63 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1b), 4,72 (1H, J= 2,52 Hz, H-1').

25

Exemple 2 : synthèse du 1'-[-(3-[4-(3-amino-propyl-amino)-butyl-amino]-méthylène-carbamoyl)-15-pentadécanyl-16-octadécyl]- α -L-6'-désoxy-manno-hexopyrannose (composé 2)

a) Synthèse du 1-ol pentadécanoate de méthyle

- 5 A 10 g de pentadécalactone (41,60 mmol) dans 41,60 cm³ de méthanol, on ajoute 6,66 cm³ de méthylate de sodium 2N (13,31 mmol) à 0°C. Après 9 heures, on ajoute 9,24 cm³ d'acide acétique et on laisse agir pendant 15 minutes. Puis on évapore à sec sous vide la solution qui est ensuite reprise par du dichlorométhane, et on effectue un lavage au bicarbonate de sodium. On sèche la phase organique obtenue par du sulfate
- 10 de magnésium et on évapore le solvant au rotavapor. La purification se fait dans un mélange hexane/acétate d'éthyle 6:4. On obtient le 1-ol-pentadécanoate de méthyle avec un rendement de 80 %.

¹H RMN (CDCl₃) : δ (ppm) 1,26 (m, 12H, (CH₂)₁₀), 1,5-1,6 (m, 4H, H-2 et H-13), 2,30 (t, 2H, J= 7.60 Hz, H-14), 3,64 (t, 1H, J= 5,84 Hz, H-1), 3,67 (s, 3H, H-16).

15 **b) Synthèse du 1'-[pentadécan-15-oate de méthyl]-2',3',4'-tri-O-acétyl- α -L-6'-désoxy-manno-hexopyrannose**

- A 0°C, on ajoute 2,49 cm³ de chlorure d'étain (21,30 mmol) à 3,55 g de rhamnose peracétylé (10,65 mmol) dans 27 cm³ de dichlorométhane pendant 30 minutes. Puis on additionne 3,48 g de 1-ol pentadécanoate de méthyle précédemment obtenu (12,78
- 20 mmol). Après 2 heures, le mélange réactionnel est dilué par de l'éther éthylique et on verse dans une solution de phosphate de sodium (Na₂PO₄). Les phases aqueuses sont extraites avec du diéthyléther et les phases organiques sont successivement lavées par une solution de carbonate de sodium, de la saumure, puis séchées par du sulfate de magnésium. Après évaporation à sec sous vide, on purifie par chromatographie
- 25 moyenne pression dans un mélange heptane/acétate d'éthyle 7:3. Le produit est obtenu avec un rendement de 60 %.

¹H RMN (CDCl₃) : δ (ppm) 1,20 (d, 3H, J= 6,45 Hz, H-6'), 1,26 (m, 12H, (CH₂)₁₀), 1,59 (m, 4H, H-2 et H-13), 1,98, 2,04 et 2,16 (s, 3H, OCOCH₃), 2,29 (t,

2H, $J = 7,62$ Hz, H-14), 3,40 (m, 1H, $J = 6,71$ Hz, H-1a), 3,66 (m, 1H, $J = 6,71$ Hz, H-1b), 3,67 (s, 3H, H-16), 3,88 (m, 1H, $J = 6,45$ Hz et 9,97 Hz, H-5'), 4,70 (d, 1H, $J = 1,72$ Hz, H-1'), 5,06 (dd, 1H, $J = 9,97$ Hz et 9,97 Hz, H-4'), 5,22 (dd, 1H, $J = 1,72$ Hz et 3,52 Hz, H-2'), 5,30 (dd, 1H, $J = 3,52$ Hz et 9,97 Hz, H-3').

5 **c) Synthèse du 1'-[pentadécan-15-oate de méthyl]- α -L-6'-désoxy-manno-hexopyrannose**

On traite 5,08 g de produit obtenu à l'étape b) (9,34 mmol) en solution dans 20 cm³ de méthanol par 9,34 ml de méthylate de sodium 2N (18,68 mmol). Lorsque la réaction est achevée, on neutralise le mélange réactionnel avec de l'Amberlite IR120, on filtre et on évapore à sec sous vide.

¹H RMN (CDCl₃) : δ (ppm) 1,20 (d, 3H, $J = 6,45$ Hz, H-6'), 1,26 (m, 12H, (CH₂)₁₀), 1,59 (m, 4H, H-2 et H-13), 2,29 (t, 2H, $J = 7,62$ Hz, H-14), 3,40 (m, 1H, $J = 6,71$ Hz, H-1a), 3,66 (m, 1H, $J = 6,71$ Hz, H-1b), 3,67 (s, 3H, H-16), 3,6-3,9 (m, 4H, H-2', H-3', H-4' et H-5'), 4,70 (d, 1H, $J = 1,72$ Hz, H-1').

15 **d) Synthèse du 1'-[pentadécan-15-oate de méthyl]-2',3',4'-tri-O-benzyl- α -L-6'-désoxy-manno-hexopyrannose**

A 2,09 g (5,00 mmol) de produit obtenu à l'étape précédente c), dans 30 cm³ de diméthylformamide (DMF) anhydre, on ajoute successivement 3,32 g d'iodure de potassium (20,00 mmol), 0,80 g d'hydruure de sodium 60 % (20,00 mmol) et 2,38 cm³ du bromure de benzyle (20,00 mmol). Après 12 heures, on ajoute 20 cm³ d'une solution saturée de chlorure d'ammonium et on laisse agir pendant 10 minutes. Puis, on dilue avec de l'eau et on extrait la phase organique par de l'acétate d'éthyle. Celle-ci est ensuite lavée avec de l'eau et de la saumure, avant d'être finalement séchée par du sulfate de magnésium.

25. Par ailleurs, un lavage supplémentaire par une solution saturée de thiosulfate de sodium est effectué afin d'éliminer les ions iodures. On évapore à sec sous vide et on purifie l'huile résultante dans un mélange heptane/acétate d'éthyle 9:1. Le produit est obtenu avec un rendement de 60 %.

¹H RMN (CDCl₃) : δ (ppm) 1,28 (m, 14H, (CH₂)₁₀), 1,33 (d, 3H, J= 6,21 Hz, H-6'), 1,59 (m, 4H, H-2 et H-13), 2,31 (t, 2H, J= 7,62 Hz, H-14), 3,40 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1a), 3,65 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 3,66 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1b), 3,67 (s, 3H, H-16), 3,68 (m, 1H, J= 9,5 Hz et 6,21 Hz, H-5'), 3,99 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,02 (dd, 1H, J= 8,96 Hz et 9,5 Hz, H-4'), 4,32 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,57 (dd, 1H, J= 2,01 Hz et 3,02 Hz, H-2'), 4,73 (1H, J= 2,01 Hz, H-1'), 4,82 (dd, J= 3,02 Hz et 8,96 Hz, H-3'), 7,35 (m, 18H, C₆H₆).

e) Synthèse du 1'-[pentadécane-15-oïque]-2',3',4'-tri-O-benzyl-α-L-6'-désoxy-manno-hexopyrannose

10 A 0,50 g (0,73 mmol) d'une solution de produit obtenu à l'étape précédente d), dans 7 cm³ de méthanol, on ajoute 4,68 ml de soude 25 %. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 30 minutes. Puis, on neutralise le mélange à froid avec une solution d'acide chlorhydrique 5 %. On extrait la phase organique par de l'acétate d'éthyle et on évapore à sec sous vide. La purification se fait dans un mélange
15 heptane/acétate d'éthyle 4:6. Le produit est obtenu avec un rendement de 72 %.

¹H RMN (CDCl₃) : δ (ppm) 1,28 (m, 14H, (CH₂)₁₀), 1,33 (d, 3H, J= 6,21 Hz, H-6'), 1,59 (m, 4H, H-2 et H-13), 2,34 (t, 2H, J= 7,62 Hz, H-14), 3,40 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1a), 3,65 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 3,66 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1b), 3,68 (m, 1H, J= 9,5 Hz et 6,21 Hz, H-5'), 3,99 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,02 (dd, 1H, J= 8,96 Hz et 9,5
20 Hz, H-4'), 4,32 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,57 (dd, 1H, J= 2,01 Hz et 3,02 Hz, H-2'), 4,73 (1H, J= 2,01 Hz, H-1'), 4,82 (dd, J= 3,02 Hz et 8,96 Hz, H-3'), 7,35 (m, 18H, C₆H₆).

f) Synthèse du 1'-[pentadécane-15-carbamoyl-16-octadécyl]-2',3',4'-tri-O-benzyl-α-L-6'-désoxy-manno-hexopyrannose

A 0,70 g (1,04 mmol) d'une solution de produit précédemment obtenu à l'étape e),
25 dans 13 cm³ de chloroforme, on ajoute successivement 0,69 g de BOP (1,56 mmol), 0,72 cm³ de diisopropyléthylamine (4,16 mmol) et 0,34 g d'octadécylamine (1,25 mmol). Lorsque la réaction est terminée, on dilue par du dichlorométhane, on effectue un lavage à l'eau, on sèche sur sulfate de magnésium, et on évapore à sec

sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie moyenne pression dans un mélange heptane/acétate d'éthyle 6:4. Le produit est obtenu avec un rendement de 84 %.

¹H RMN (CDCl₃) : δ (ppm) 0,88 (t, 3H, J= 6,36 Hz, H-33), 1,27 (m, 14H, (CH₂)₂₅),
 5 1,33 (d, 3H, J= 6,21 Hz, H-6'), 1,47 (m, 4H, H-2 et H-17), 1,58 (m, 2H, H-13), 2,13
 (t, 2H, J= 7,92 Hz, H-14), 3,23 (m, 2H, H-16), 3,40 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1a), 3,65
 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 3,66 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1b), 3,68 (m, 1H, J= 9,5 Hz et 6,21
 Hz, H-5'), 3,99 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,02 (dd, 1H, J= 8,96 Hz et 9,5 Hz, H-4'), 4,32 (s,
 2H, CH₂C₆H₆), 4,57 (dd, 1H, J= 2,01 Hz et 3,02 Hz, H-2'), 4,73 (1H, J= 2,01 Hz, H-
 10 1'), 4,82 (dd, J= 3,02 Hz et 8,96 Hz, H-3'), 5,37 (bande, 1H, HNCO), 7,35 (m, 18H,
 C₆H₆).

g) Synthèse du 1'-[pentadecan-15-amino-16-octadecyl]-2',3',4'-tri-O-benzyl-α-L-6'-désoxy-manno-hexopyrannose

A 0,81 g (0,86 mmol) de produit obtenu à l'étape précédente f), dans 15 cm³ de
 15 tétrahydrofurane (THF) anhydre, on ajoute 0,065 g d'hydruure de lithium; aluminium
 AlLiH₄ (1,72 mmol), et on chauffe à reflux pendant 10 heures. Puis, le mélange
 réactionnel est refroidi dans de un bain de glace et on ajoute 65 µl d'eau, puis 130 µl
 de soude 2N au bout de 10 minutes, et enfin à nouveau 65 µl d'eau après 10 minutes.
 On filtre et on évapore à sec sous vide. La purification se fait dans un mélange
 20 dichlorométhane/méthanol/ammoniac 28% 9:2:0,5. Le produit est obtenu avec un
 rendement de 93 %.

¹H RMN (CDCl₃) : δ (ppm) 0,88 (t, 3H, J= 6,36 Hz, H-33), 1,27 (m, 14H, (CH₂)₂₅),
 1,33 (d, 3H, J= 6,21 Hz, H-6'), 1,4-1,6 (m, 9H, H-2, H-17, H-14, H-17et NH), 2,57
 (t, 4H, J= 7,92 Hz, H-15 et H-16), 3,40 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1a), 3,65 (s, 2H,
 25 CH₂C₆H₆), 3,66 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1b), 3,68 (m, 1H, J= 9,5 Hz et 6,21 Hz, H-
 5'), 3,99 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,02 (dd, 1H, J= 8,96 Hz et 9,5 Hz, H-4'), 4,32 (s, 2H,
 CH₂C₆H₆), 4,57 (dd, 1H, J= 2,01 Hz et 3,02 Hz, H-2'), 4,73 (1H, J= 2,01 Hz, H-1'),
 4,82 (dd, J= 3,02 Hz et 8,96 Hz, H-3'), 7,35 (m, 18H, C₆H₆).

h) Synthèse du 1'-[-(3-[4-(3-tert-butoxycarbonyl-amino-propyl-tert-butoxycarbonyl-amino)-butyl-tert-butoxycarbonyl-amino]-méthylène-carbamoyl)-15-pentadécanyl-16-octadécyl]-2',3',4'-tri-O-benzyl- α -L-6'-désoxy-manno-hexopyrannose

- 5 A 0,78 g (0,86 mmol) d'une solution de produit obtenu à l'étape précédente g), en solution dans 7 cm³ de chloroforme, on ajoute successivement 0,53 g de BOP (1,20 mmol), 0,30 cm³ de diisopropyléthylamine (1,72 mmol) et 0,62 g de FRM 375 (0,95 mmol). Après 4 heures, on dilue avec du dichlorométhane, on effectue un lavage à l'eau, on sèche sur sulfate de magnésium, et on évapore à sec sous vide. Le produit
- 10 obtenu est purifié par chromatographie "flash" dans un mélange heptane/acétate d'éthyle 6:4. Le produit est obtenu avec un rendement de 72 %.

¹H RMN (CDCl₃) : δ (ppm) 0,88 (t, 3H, J= 6,36 Hz, H-33), 1,27 (m, 14H, (CH₂)₂₅), 1,33 (d, 3H, J= 6,21 Hz, H-6'), 1,4-1,6 (m, 17H, H-2, H-17, H-14, H-17, H-37, H-40, H-41 et H-44), 1,46 (m, 36H, Boc), 2,8-2,9 (m, 6H, H-15, H-16 et H-35), 3,09-3,33 (m, 12H, H-36, H-38, H-39, H-42, H-43 et H-45), 3,40 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1a), 3,65 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 3,66 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1b), 3,68 (m, 1H, J= 9,5 Hz et 6,21 Hz, H-5'), 3,99 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,02 (dd, 1H, J= 8,96 Hz et 9,5 Hz, H-4'), 4,32 (s, 2H, CH₂C₆H₆), 4,57 (dd, 1H, J= 2,01 Hz et 3,02 Hz, H-2'), 4,73 (1H, J= 2,01 Hz, H-1'), 4,82 (dd, J= 3,02 Hz et 8,96 Hz, H-3'), 7,35 (m, 18H, C₆H₆).

20 **i) Synthèse du 1'-[-(3-[4-(3-tert-butoxycarbonyl-amino-propyl-tert-butoxycarbonyl-amino)-butyl-tert-butoxycarbonyl-amino]-méthylène-carbamoyl)-15-pentadécanyl-16-octadécyl]- α -L-6'-désoxy-manno-hexopyrannose**

- A 0,74 g (0,48 mmol) de produit obtenu à l'étape précédente h), en solution dans 10 cm³ de méthanol, on ajoute 10 % (0,034 g) de palladium sur charbon. La solution
- 25 est agité sous pression d'hydrogène à température ambiante. Après 4 heures, on filtre puis on évapore à sec sous vide. La réaction est quantitative.

¹H RMN (CD₃OD) : δ (ppm) 0,88 (t, 3H, J= 6,36 Hz, H-33), 1,20 (d, 3H, J= 6,45 Hz, H-6'), 1,27 (m, 14H, (CH₂)₂₅), 1,4-1,6 (m, 17H, H-2, H-17, H-14, H-17, H-37, H-40, H-41 et H-44), 1,46 (m, 36H, Boc), 2,8-2,9 (m, 6H, H-15, H-16 et H-35), 3,09-

3,33 (m, 12H, H-36, H-38, H-39, H-42, H-43 et H-45), 3,40 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1a), 3,66 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1b), 3,6-3,9 (m, 4H, H-2', H-3', H-4' et H-5'), 4,73 (1H, J= 2,01 Hz, H-1').

5 **j) Synthèse du 1'-[-(3-[4-(3-amino-propyl-amino)-butyl-amino]-méthylène-carbamoyl)-15-pentadécanyl-16-octadécyl]- α -L-6'-désoxy-manno-hexopyran-nose (composé 2)**

A 0,40 g (0,31 mmol) de produit obtenu à l'étape précédente i), on ajoute 24 cm³ de tétrahydrofurane (THF) distillé. Après 1 heure, le mélange réactionnel est évaporé sous vide à froid et à sec, puis est lyophilisé. On vérifie le degré de pureté du produit en solution dans du méthanol par CLHP.

10 ¹H RMN (CD₃OD) : δ (ppm) 0,88 (t, 3H, J= 6,36 Hz, H-33), 1,20 (d, 3H, J= 6,45 Hz, H-6'), 1,27 (m, 14H, (CH₂)₂₅), 1,4-1,6 (m, 17H, H-2, H-17, H-14, H-17, H-37, H-40, H-41 et H-44), 2,8-2,9 (m, 6H, H-15, H-16 et H-35), 2,92 (m, 2H, H-45), 2,92-3,17 (m, 12H, H-36, H-38, H-39, H-42, H-43), 3,40 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1a), 15 3,66 (m, 1H, J= 6,71 Hz, H-1b), 3,6-3,9 (m, 4H, H-2', H-3', H-4' et H-5'), 4,73 (1H, J= 2,01 Hz, H-1').

B\ UTILISATION DES AGENTS DE TRANSFERT SELON L'INVENTION

Exemple 3 : préparation de complexes agent de transfert/acide nucléique avec le composé 2 et mesure de leur taille

20 Cet exemple illustre la préparation de complexes entre un agent de transfert selon l'invention et un acide nucléique, leur taille ayant ensuite été mesurée.

Le glycolipide utilisé dans cet exemple et dans les exemples qui suivent est le composé 2, en solution dans du chloroforme, à une concentration de 10 mg/ml. Dans certains cas, un co-lipide neutre, cholestérol ou DOPE, a été préalablement mélangé au composé 2.

25 La solution lipidique est préparée de la façon suivante : un échantillon de quantité désirée est prélevé, le solvant est évaporé sous flux d'argon et on laisse sécher pendant

1 heure. Puis, le lipide est réhydraté avec une solution contenant du dextrose 5% et 10 mM de chlorure de sodium pendant toute une nuit à 4°C. Le jour suivant, les solutions lipidiques sont chauffées à 60°C pendant 5 minutes puis passées aux ultrasons pendant 1 minute. L'opération est répétée jusqu'à ce que la taille des particules lipidiques soit stable.

L'ADN utilisé est le plasmide pXL3031 (figure 1) en solution dans un mélange de dextrose 5% et de chlorure de sodium 10 mM à une concentration de 0,5 mg/ml ou de 1,0 mg/ml. Ce plasmide contient le gène luc codant pour la luciférase sous contrôle du promoteur P/E CMV du cytomégalo virus. Sa taille est de 3671 bp. Le schéma de ce plasmide est représentée à la figure 1. Le plasmide pXL3031 a été purifié selon les méthodes décrites dans la demande de brevet WO 97/35002.

Les complexes composé 2/ADN sont préparés en mélangeant rapidement des volumes appropriés de solution d'ADN plasmidique et de composé 2 (selon le rapport de charges désiré), à température ambiante. La quantité d'agent transfectant varie entre 0,25 nmoles/ μ g d'ADN et 12 nmoles/ μ g d'ADN.

La taille des complexes a été analysée en mesurant le diamètre hydrodynamique par diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Laser Light Scattering) à l'aide d'un appareil Coulter N4Plus. Les échantillons sont dilués 20 fois dans une solution contenant 5% de dextrose et 20 mM de chlorure de sodium pour éviter les diffusions multiples.

A un rapport de 3 nmoles de lipide/ μ g d'ADN, les résultats suivants ont été obtenus :

	Taille en nm
Micelles	130 nm
formulation avec du Cholestérol	153 nm
Formulation avec de la DOPE	137 nm

Le terme "micelles" indique que le composé 2 a été utilisé seul, c'est-à-dire sans ajout de co-lipide neutre, et il forme donc une solution micellaire.

Ce tableau montre que les complexes obtenus ont une taille comprise entre 130 nm et 150 nm environ, ce qui est compatible avec une utilisation pharmaceutique, notamment en injection.

5 **Exemple 4 : Comportement des complexes formés à partir du composé 2 à différents rapports de charge**

Cet exemple illustre le comportement des complexes agent de transfert selon l'invention/acide nucléique lorsqu'on fait varier le rapport de charge. L'impact de l'ajout d'un co-lipide (cholestérol ou DOPE) est également illustré.

10 De façon classique, on distingue 3 phases physico-chimiques lorsqu'on augmente le rapport de charges agents de transfert/ADN (B. Pitard et al., *Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer*, PNAS, Vol. 94, pp. 14412-14417, 1997). Ces trois phases déterminent le potentiel thérapeutique de l'agent de transfert.

15 A faible rapport de charge, l'ADN n'est pas saturé par l'agent de transfert. Il reste encore de l'ADN non-complexé, et les complexes sont globalement chargés négativement et de petite taille. Cette phase, stable, est appelée "Phase A".

Le fait que l'ADN ne soit pas complètement saturé par l'agent de transfert signifie que l'ADN n'est pas complètement protégé. L'ADN peut donc être soumis aux dégradations par les enzymes. Par ailleurs, les complexes étant globalement négatifs, le
20 passage de la membrane cellulaires est difficile. Pour ces raisons, les complexes nucléolipidiques de la phase A sont relativement inactifs.

A rapport de charge intermédiaire, l'ADN est complètement saturé par l'agent de transfert, et les complexes sont globalement neutres ou légèrement positifs. Cette phase est instable car les répulsions ioniques sont minimales et un phénomène de
25 "crosslinking" (réticulation) peut se produire. La taille des particules est bien au dessus de la limite de détection par diffusion dynamique de la lumière (très supérieure à 3 μm). Cette phase instable est appelée "phase B". Une telle taille de complexes n'est pas adaptée pour des utilisations en injection, bien que cela ne signifie pas que les

complexes soient inactifs dans la phase B : ils sont seulement sous une formulation qui n'est pas appropriée pour leur injection dans un but pharmaceutique.

A rapport de charge plus élevé, l'ADN est sur-saturé par l'agent de transfert, et les complexes sont globalement positifs. Du fait des fortes répulsions entre les charges positives, cette phase est stable. Elle est désignée sous le nom de "phase C".

Contrairement à la phase A, les complexes obtenus sont sous une forme telle que l'ADN est très bien protégé vis-à-vis des enzymes, et leur charge globalement positive facilite le passage de la membrane cellulaire de nature anionique. Les complexes de la phase C sont donc particulièrement adaptés à une utilisation pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules.

Ces 3 zones A, B et C ont été également mises à jour avec le composé 2 selon l'invention comme agent de transfert :

Rapport de charges	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2	3	4	6	8	10	12
Micelles	A	A	B	B	B	B	C	C	C	C	C	C
+ Cholestérol	A	A	B	B	B	C	C	C	C	C	C	C
+ DOPE	A	A	B	B	B	C	C	C	C	C	C	C

Comme le montre le tableau ci-dessus, la zone B, qui est la zone d'instabilité, est particulièrement petite et se situe à des rapports de charge très faibles. La zone C commence dès 2 nmoles de lipide/ μ g d'ADN lorsque le composé 2 est utilisé conjointement à un co-lipide (Cholestérol ou DOPE), et à partir de 3 nmoles de lipide/ μ g d'ADN lorsque le composé est utilisé seul. Comme cela a été précisé précédemment, c'est dans cette zone qu'il est particulièrement avantageux de se placer pour une utilisation pharmaceutique.

Ainsi, le composé 2 est un agent de transfert particulièrement avantageux car il est stable à de faibles rapports de charge, ce qui permet de former des complexes stables

avec de faibles quantités de glycolipides, avec les conséquences bénéfiques qui en découle sur le plan de la toxicité.

Exemple 5 : utilisation du composé 2 pour le transfert *in vitro* d'ADN

Cet exemple illustre la capacité des agents de transfert selon l'invention à transférer
5 l'ADN dans les cellules *in vitro*, à différents rapports de charge, en l'absence et en présence d'un co-lipide neutre (cholestérol ou DOPE).

Des microplaques de 24 puits sontensemencées avec 60000 cellules HeLa par puit, et sont mises en croissance une nuit. Le nombre de cellules après une nuit, et donc au moment de la transfection, est de 100000 cellules par puit.

10 Chaque puit est mis en contact avec les complexes formés avec le composé 2 et contenant 1 µg d'ADN plasmidique dans 0,5 ml de milieu de culture DMEM (Gibco/BRL sans sérum.. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 5 heures. Le milieu contenant les complexes est ensuite enlevé et remplacé par un milieu de culture
15 culture pendant 24 heures. Enfin, les cellules sont lysées et testées en utilisant un kit de test de luciférase (Promega) et un luminomètre Dynex MLX.

Les résultats obtenus sont indiqués sur l'histogramme de la figure 2. L'efficacité du transfert est représentée par l'expression de la luciférase en pg/puit. On constate que la transfection maximale est de 500 pg/puit environ.

20 En conclusion, cet exemple montre clairement qu'il est possible d'utiliser le composé 2 selon l'invention pour former des complexes susceptible de promouvoir le transfert de l'ADN dans les cellules *in vitro*.

Exemple 6 : utilisation du composé 2 pour le transfert *in vivo* d'ADN

Cet exemple illustre la capacité des agents de transfert selon l'invention à transférer
25 l'ADN dans les cellules *in vivo*.

Le transfert de gène *in vivo* a été effectué sur des souris Balb/C par administration intratrachéale, intraveineuse et intramusculaire.

Dans le cas des injections intramusculaires, chaque souris a reçu 30 μ l de formulation contenant 15 μ g d'ADN plasmidique dans le muscle antérieur du tibia. Les tissus sont récupérés 7 jours après l'injection, ils sont congelés et stockés à -80°C en attendant d'effectuer les tests d'activité luciférase.

- 5 Dans le cas des injections par voie intraveineuse, chaque souris a reçu 200 μ l de formulation contenant 50 μ g d'ADN plasmidique. Les tissus sont récupérés 24 heures après l'injection, puis sont congelés et stockés de la même façon que précédemment.

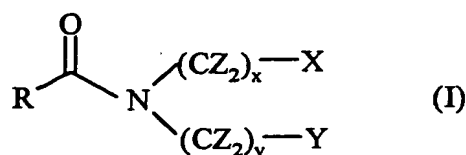
- 10 La figure 3 illustre l'activité des complexes formés avec le composé 2 pour le transfert de gène *in vivo* en intramusculaire. Ces résultats montrent clairement que la formation de complexes avec le composé 2 selon l'invention et de l'ADN permet de promouvoir le transfert dudit ADN dans les cellules *in vivo*.

De la même façon, on peut utiliser tout agent de transfert tel que défini dans la présente invention pour promouvoir le transfert d'ADN dans les cellules.

REVENDICATIONS

1. Agents de transfert d'acides nucléiques caractérisés en ce qu'ils comportent une partie hydrophobe liée à au moins deux parties hydrophiles dont l'une au moins est un sucre.

5 2. Agents de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 1 de formule générale (I) :

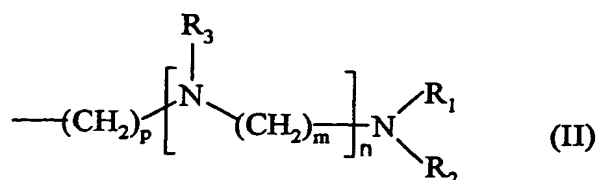


pour laquelle :

- R représente un polycation,
- 10 - Z représente un atome d'hydrogène ou un atome de fluor, les différents Z étant indépendants les uns des autres,
- x et y, indépendamment l'un de l'autre, représentent un entier compris entre 10 et 22 inclus, et
- X et Y, indépendamment l'un de l'autre, représentent un atome d'hydrogène, un
- 15 groupement OAlk, Alk représentant un alkyle droit ou ramifié contenant 1 à 4 atomes de carbone, un groupement amino, un sucre, un peptide, un oligonucléotide ou un marqueur,
- l'un au moins des substituants X et Y étant un sucre,
- le cas échéant sous leurs formes isomères, ainsi que leurs mélanges, ou leurs sels
- 20 lorsqu'ils existent.

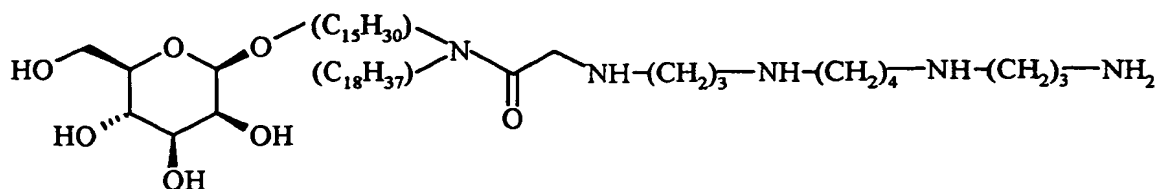
3. Agents de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 2 caractérisés en ce que le ou les sucres sont des molécules de mono-, oligo- ou polysaccharide qui interagissent avec des récepteurs cellulaires.

4. Agents de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 3 caractérisés en ce que ledit ou lesdits sucres sont le glucose, le mannose, le rhamnose, le galactose, le fructose, le maltose, le lactose, le saccharose, le sucrose, le fucose, le cellobiose, l'allose, le laminarabiose, le gentiobiose, le sophorose, ou le mélibiose.
- 5 5. Agents de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 3 caractérisés en ce que ledit ou lesdits sucres sont des sucres complexes.
6. Agents de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 2 caractérisés en ce que ledit oligonucléotide est toute chaîne contenant un ou plusieurs nucléotides, désoxynucléotides, ribonucléotides et /ou désoxyribonucléotides, éventuellement
10 couplée à une ou plusieurs molécules ayant des propriétés distinctes.
7. Agents de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 2 caractérisés en ce que ledit peptide est toute chaîne contenant un ou plusieurs acides aminés liés entre eux par des liaisons de nature peptidique, éventuellement substituée par un ou plusieurs groupes aliphatiques qui peuvent être saturés ou insaturés, et linéaires,
15 ramifiés ou cycliques.
8. Agents de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 2 caractérisés en ce que ledit marqueur est tout agent permettant l'identification par des techniques d'analyses comme la spectrométrie de fluorescence, la spectrométrie infrarouge ou la résonance magnétique nucléaire.
- 20 9. Agents de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 2 caractérisés en ce que le polycation R est une molécule hydrophile linéaire ou ramifiée polycationique susceptible de s'associer avec l'acide nucléique.
10. Agents de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 2 ou 9 caractérisés en ce que le polycation R représente une polyamine de formule générale (II) :

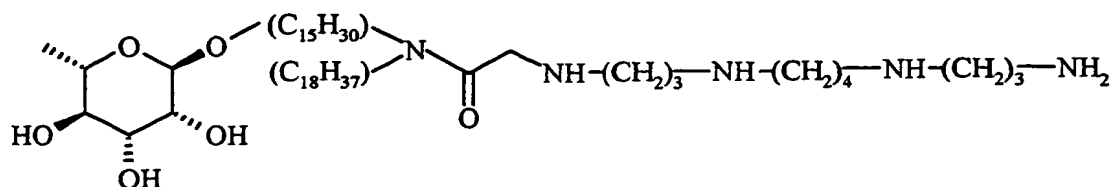


dans laquelle :

- R₁, R₂ et R₃ représentent indépendamment les uns des autres un atome d'hydrogène ou un groupement (CH₂)_qNR'R'' avec q un nombre entier pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 inclus, ceci de manière indépendante entre les différents groupements R₁, R₂ et R₃,
 - R' et R'' représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement (CH₂)_qNH₂ avec q défini comme précédemment, et
 - m, n et p représentent indépendamment les uns des autres un nombre entier pouvant varier entre 0, 1, 2, 3, 4, 5 et 6 inclus, avec lorsque n est supérieur à 1, m pouvant prendre des valeurs différentes et R₃ des significations différentes au sein de la formule générale (II).
11. Agent de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 10 caractérisés en ce que le polycation R représente la spermine ou la spermidine.
12. Agents de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 2 caractérisés en ce que, dans la formule générale (I), Y représente un atome d'hydrogène et X représente un sucre.
13. Agents de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 11 caractérisés en ce que en outre le polycation R représente une polyamine de formule générale (II) définie à la revendication 10.
14. Agent de transfert selon la revendication 1 de formule :



15. Agent de transfert selon la revendication 1 de formule :



16. Composition caractérisée en ce qu'elle contient un agent de transfert d'acides nucléiques tel que défini dans les revendications précédentes et un acide nucléique.

17. Composition selon la revendication 16 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide désoxyribonucléique ou bien un acide ribonucléique.

18. Composition selon la revendication 16 ou 17 caractérisée en ce que ledit acide nucléique comprend un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique sous contrôle de séquences de régulation.

19. Composition selon les revendications 16 à 18 caractérisée en ce que ledit acide nucléique est un gène ou une séquence antisens.

20. Composition selon la revendication 16 caractérisée en ce qu'elle contient en outre un ou plusieurs adjuvants.

21. Composition selon la revendication 20 caractérisée en ce que l'adjuvant est un ou plusieurs lipides neutres.

22. Composition selon la revendication 21 caractérisée en ce que les lipides neutres sont des lipides à deux chaînes grasses.

23. Composition selon les revendications 21 et 22 caractérisée en ce que les lipides neutres sont des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologiques, choisis par exemple parmi la dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléylpalmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoylphosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivés N-méthylés 1 à 3 fois, les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérebrosides (tels que notamment les galactocérebrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).
- 10 24. Composition selon la revendication 20 caractérisée en ce que ledit adjuvant est un composé intervenant directement ou non au niveau de la condensation de l'acide nucléique.
- 15 25. Composition selon la revendication 24 caractérisée en ce que ledit adjuvant dérive en tout ou en partie d'une protamine, d'une histone, ou d'une nucléoline et/ou de l'un de leur dérivés, ou bien est constitué, en tout ou en partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou(ATPAKKAA), le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10, et pouvant être répétés de manière continue ou non.
26. Composition selon les revendications 16 à 25 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.
- 20 27. Composition selon les revendications 16 à 25 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une application sur la peau et/ou les muqueuses.
28. Utilisation d'un agent de transfert selon l'une des revendications 1 à 15 pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules.
- 25 29. Utilisation d'un agent de transfert selon l'une des revendications 1 à 15 pour la préparation d'un médicament destiné à traiter les maladies résultant d'une déficience en un produit protéique ou nucléique.

30. Méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- (1) la mise en contact de l'acide nucléique avec un agent de transfert tel que défini dans les revendications 1 à 14, pour former un complexe, et
- 5 (2) la mise en contact des cellules avec le complexe formé en (1).

31. Méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules selon la revendication 30 caractérisée en ce que ledit agent de transfert et/ou ledit acide nucléique sont préalablement mélangés à un ou plusieurs adjuvant(s) tels que définis précédemment.

23. Composition selon les revendications 21 et 22 caractérisée en ce que les lipides neutres sont des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologiques, choisis par exemple parmi la dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléylpalmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoylphosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivés N-méthylés 1 à 3 fois, les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérebrosides (tels que notamment les galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).
- 10 24. Composition selon la revendication 20 caractérisée en ce que ledit adjuvant est un composé intervenant directement ou non au niveau de la condensation de l'acide nucléique.
- 15 25. Composition selon la revendication 24 caractérisée en ce que ledit adjuvant dérive en tout ou en partie d'une protamine, d'une histone, ou d'une nucléoline et/ou de l'un de leur dérivés, ou bien est constitué, en tout ou en partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou(ATPAKKAA), le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10, et pouvant être répétés de manière continue ou non.
26. Composition selon les revendications 16 à 25 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.
- 20 27. Composition selon les revendications 16 à 25 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une application sur la peau et/ou les muqueuses.
28. Utilisation d'un agent de transfert selon l'une des revendications 1 à 15 pour la fabrication d'un médicament.
- 25 29. Utilisation d'un agent de transfert selon l'une des revendications 1 à 15 pour la préparation d'un médicament destiné à traiter les maladies résultant d'une déficience en un produit protéique ou nucléique.

30. Méthode de transfert d'acides nucléiques *in vitro* ou *ex vivo* dans les cellules caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

(1) la mise en contact de l'acide nucléique avec un agent de transfert tel que défini dans les revendications 1 à 14, pour former un complexe, et

5 (2) la mise en contact des cellules avec le complexe formé en (1).

31. Méthode de transfert d'acides nucléiques *in vitro* ou *ex vivo* dans les cellules selon la revendication 30 caractérisée en ce que ledit agent de transfert et/ou ledit acide nucléique sont préalablement mélangés à un ou plusieurs adjuvant(s) tels que définis précédemment.

FIG. 1/3

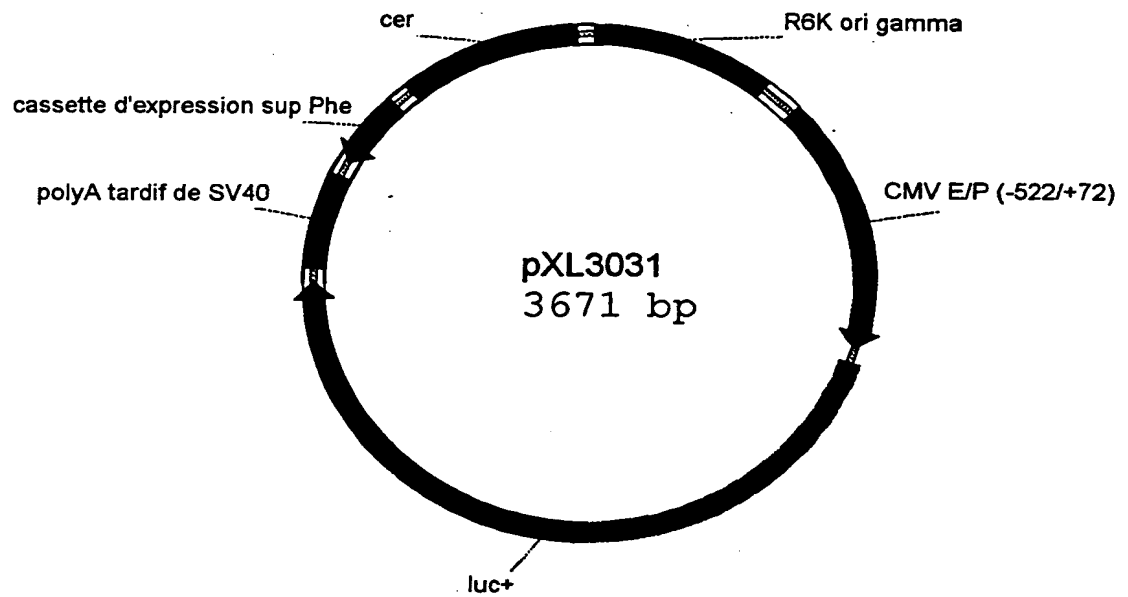


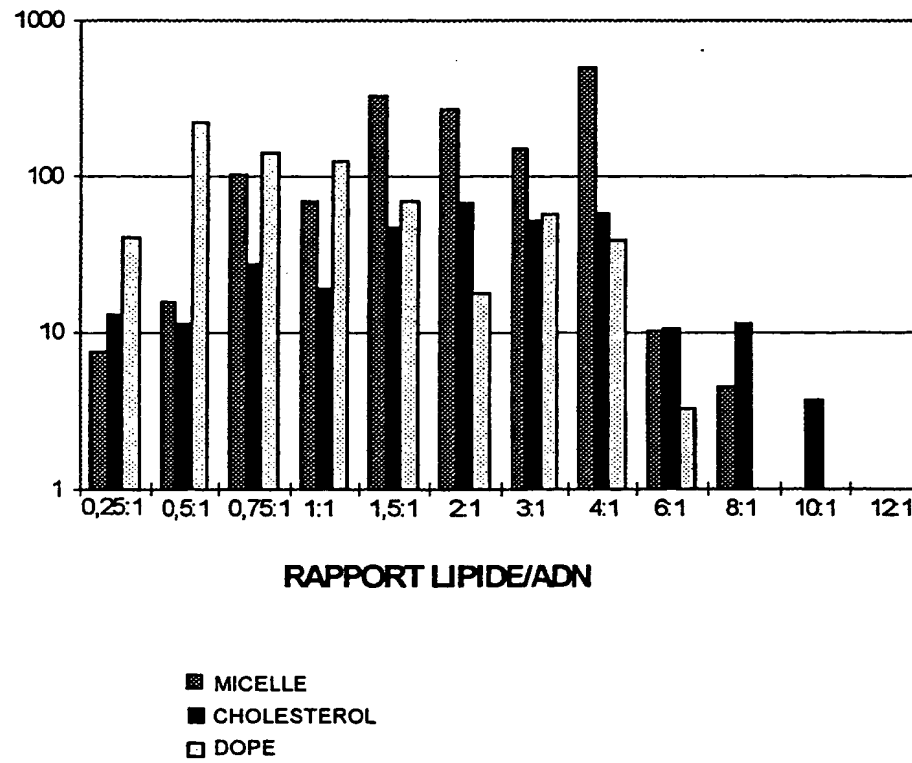
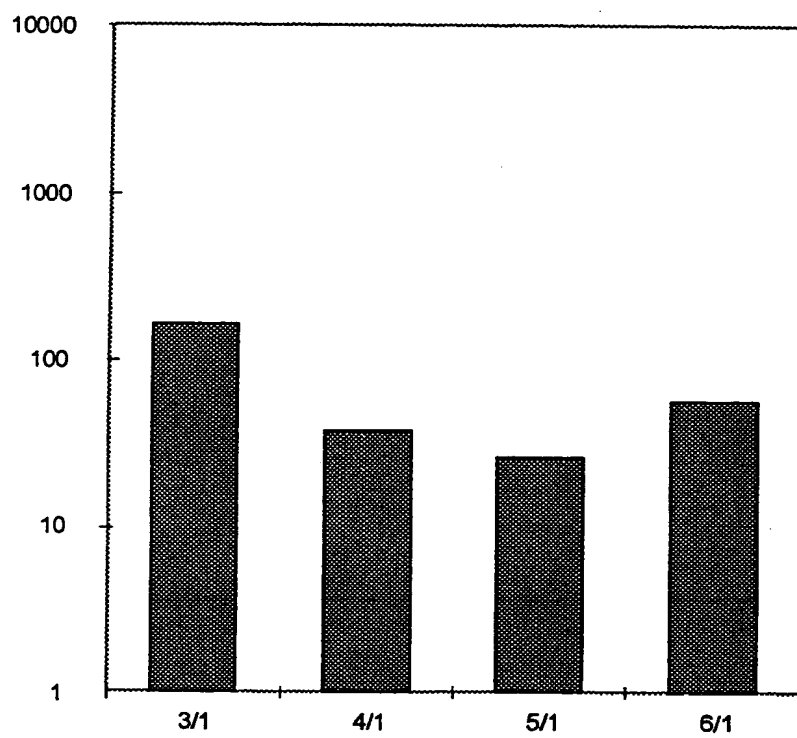
FIG. 2/3

FIG. 3/3

Luciférase (pg/muscle)



Composé 2/ADN (nmoles/ug)

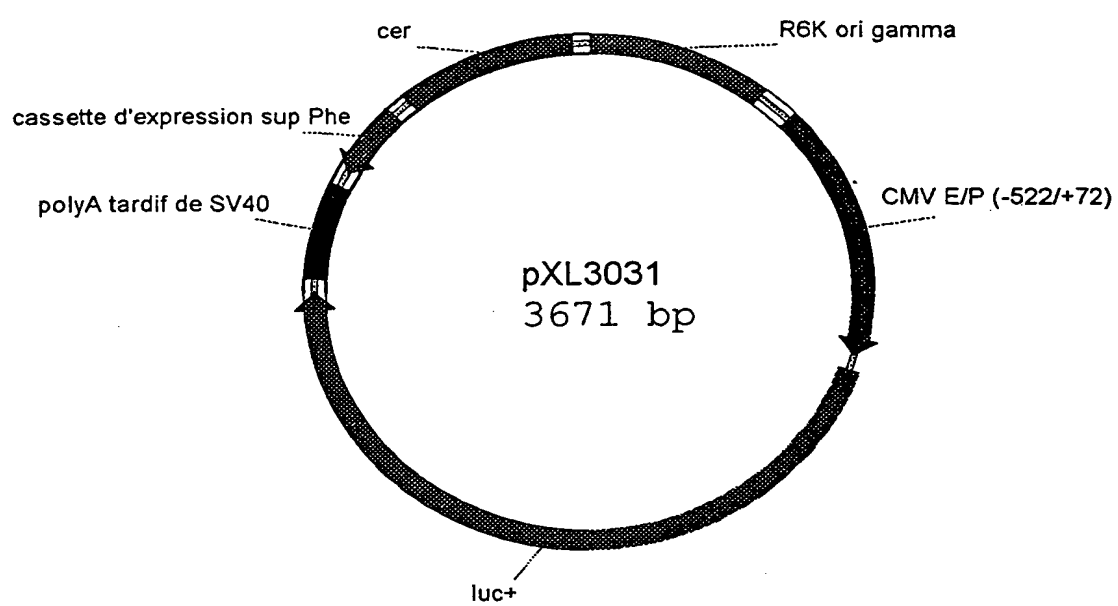
FIG. 1

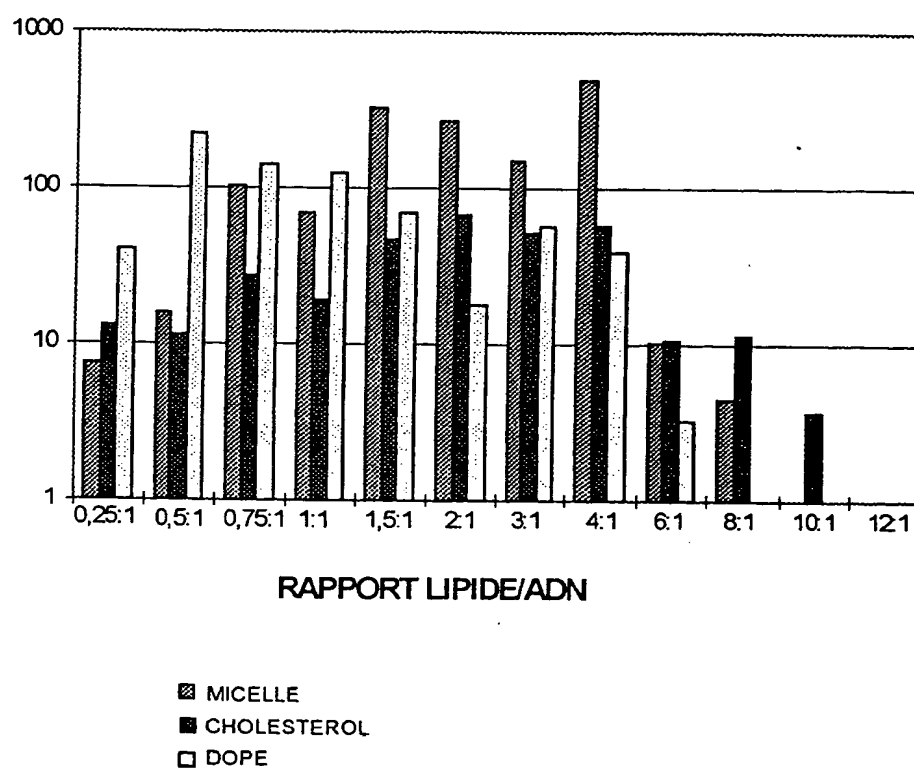
FIG. 2

FIG. 3**Luciférase (pg/muscle)**